(19) 日本国特許庁(JP)　(12) 公 表 特 許 公 報(A)　(11) 特許出願公表番号
特表2013-508739
(P2013-508739A)
(43) 公表日　平成25年3月7日(2013.3.7)

(51) Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
G01N 30/88	(2006.01)	G01N	30/88	J	4C085
G01N 30/06	(2006.01)	G01N	30/88	201G	4C086
G01N 30/86	(2006.01)	G01N	30/06	E	
G01N 30/04	(2006.01)	G01N	30/86	E	
A61K 39/395	(2006.01)	G01N	30/04	P	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 88 頁）　最終頁に続く

(21) 出願番号　特願2012-536962 (P2012-536962)
(86) (22) 出願日　平成22年10月26日 (2010.10.26)
(85) 翻訳文提出日　平成24年6月25日 (2012.6.25)
(86) 国際出願番号　PCT/US2010/054125
(87) 国際公開番号　WO2011/056590
(87) 国際公開日　平成23年5月12日 (2011.5.12)
(31) 優先権主張番号　61/255,048
(32) 優先日　平成21年10月26日 (2009.10.26)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(31) 優先権主張番号　61/262,877
(32) 優先日　平成21年11月19日 (2009.11.19)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(31) 優先権主張番号　61/324,635
(32) 優先日　平成22年4月15日 (2010.4.15)
(33) 優先権主張国　米国 (US)

(71) 出願人　599132904
ネステク　ソシエテ　アノニム
スイス国，ブベイ，アブニュー　ネスレ　５５
(74) 代理人　100088155
弁理士　長谷川　芳樹
(74) 代理人　100114270
弁理士　黒川　朋也
(74) 代理人　100128381
弁理士　清水　義憲
(74) 代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74) 代理人　100140453
弁理士　戸津　洋介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ＴＮＦ薬及び自己抗体の検出用アッセイ

(57) 【要約】
本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬治療剤及び自己抗体の存在又はレベルを検出及び測定するアッセイを提供する。本発明は、治療を最適化し及び抗ＴＮＦα薬治療を受けている患者を監視して前記薬剤に対する自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ及び／又はＨＡＨＡ）の存在又はレベルを検出するのに有効である。

(1) Preparation of Alexa647-labeled Remicade
(2) Incubation with patient serum (HACA) to form the complex
(3) Quantification of the complex by SE-HPLC
(4) Assay works in the presence of remicade

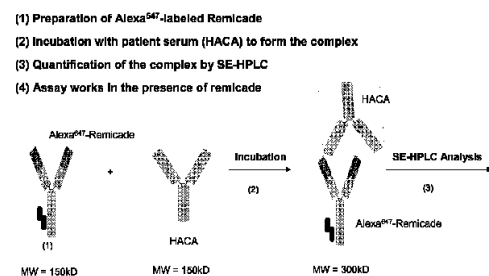



FIG. 4

【特許請求の範囲】
【請求項１】
　抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者に対する前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）前記被験者由来の第一の試料中の前記抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第一の試料を或る量の標識されたＴＮＦαと接触させて前記標識されたＴＮＦαを前記抗ＴＮＦα薬と共に含む第一の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第一の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルを測定する工程と、
を含む工程と；
（ｂ）前記被験者由来の第二の試料中の前記抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第二の試料を或る量の標識された抗ＴＮＦα薬と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬を前記自己抗体と共に含む第二の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第二の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記自己抗体の前記レベルを測定する工程と、
を含む工程と；及び
（ｃ）工程（ａ）において測定された前記抗ＴＮＦα薬のレベルから工程（ｂ）において測定された前記自己抗体のレベルを減算し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と、
を含む、前記方法。
【請求項２】
　前記工程（ａ）（ｉｉ）における検出が、以下の工程：
（１）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の第一プロットから前記標識されたＴＮＦαのピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（２）前記第一のプロットから前記第一の複合体のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（３）工程（２）から得られる積分を工程（１）から得られる積分で除することによって比を決定する工程と；及び
（４）前記標識されたＴＮＦαの前記量に工程（３）の前記比を乗ずる工程と、
を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
　工程（ｂ）（ｉｉ）における前記検出が、以下の工程：
（１）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の第二プロットから前記標識された抗ＴＮＦα薬のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（２）前記第二のプロットから前記第二の複合体のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（３）工程（２）から得られる積分を工程（１）から得られる積分で除することによって比を決定する工程と；及び
（４）前記標識された抗ＴＮＦα薬の前記量に工程（３）の前記比を乗ずる工程と、
を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
　前記第一の試料及び第二の試料の双方が血清試料である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
　工程（ａ）（ｉｉ）及び／又は工程（ｂ）（ｉｉ）における前記検出が蛍光標識検出を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

10
20
30
40
50

【請求項６】
抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する方法であって、以下の工程：
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載の方法に従って前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と；
（ｂ）前記抗ＴＮＦα薬の前記有効量を前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルと比較する工程と；及び
（ｃ）工程（ｂ）の比較に基づいて前記被験者に対する前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を決定し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程と、
を含む、前記方法。
【請求項７】
以下の工程：
（ｄ）前記抗ＴＮＦα薬の有効量が前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルより少ない場合に、前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させる工程、
をさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記抗ＴＮＦα薬の有効量が前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルとほぼ等しくなるように前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させる、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記抗ＴＮＦα薬が、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗ＴＮＦα薬がアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記抗ＴＮＦα薬がエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記標識されたＴＮＦαがフルオロフォア標識されたＴＮＦαである、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記測定された抗ＴＮＦα薬を定量化する、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
最初に前記第一の複合体が、次いでフリーの標識されたＴＮＦαが溶出される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
最初に前記第二の複合体が、次いでフリーの標識されたＴＮＦα薬が溶出される、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記サイズ排除クロマトグラフィーがサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）である、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９】
前記自己抗体がヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記測定された抗体を定量化する、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記被験者から前記抗ＴＮＦα薬を用いた治療の間に前記第一の試料及び第二の試料の双方を得る、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における治療を最適化し及び／又は前記抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する方法であって、以下の工程：
（ａ）前記被験者由来の第一の試料中の前記抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程と；
（ｂ）前記被験者由来の第二の試料中の前記抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程と；及び
（ｃ）前記抗ＴＮＦα薬のレベル及び前記自己抗体のレベルに基づいて前記被験者に対する今後の治療過程を決定し、それによって治療を最適化し及び／又は前記抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する工程、
を含む、前記方法。
【請求項２３】
前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルが高レベルでありかつ前記自己抗体の前記レベルが低レベルである場合に、今後の治療過程が、前記抗ＴＮＦα薬と一緒に免疫抑制薬を同時投与することを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルが中レベルでありかつ前記自己抗体の前記レベルが低レベルである場合に、今後の治療過程が、前記抗ＴＮＦα薬のレベルを増加させかつ免疫抑制薬を同時投与することを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルが中レベルでありかつ前記自己抗体の前記レベルが中レベルである場合に、今後の治療過程が、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２６】
前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルが低レベルでありかつ前記自己抗体の前記レベルが高レベルである場合に、今後の治療過程が、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２７】
インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））の代わりにアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））を投与する、請求項２５又は２６に記載の方法。
【請求項２８】
以下の工程：
（ｉ）前記第一の試料を或る量の標識されたＴＮＦαと接触させて前記標識されたＴＮＦαを前記抗ＴＮＦα薬と共に含む第一の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第一の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルを測定する工程と、
を含むアッセイを用いて前記抗ＴＮＦα薬を測定する、請求項２２～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
以下の工程：
（ｉ）前記第二の試料を或る量の標識された抗ＴＮＦα薬と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬を前記自己抗体と共に含む第二の複合体を形成する工程と；及び

（ｉｉ）前記第二の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記自己抗体の前記レベルを測定する工程と、
を含むアッセイを用いて前記自己抗体を測定する、請求項２２～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記抗ＴＮＦα薬がＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記抗ＴＮＦα薬がアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記抗ＴＮＦα薬がエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記測定された抗ＴＮＦα薬を定量化する、請求項２２～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記測定された自己抗体を定量化する、請求項２２～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記第一の試料及び第二の試料の双方が血清試料である、請求項２２～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記被験者から前記抗ＴＮＦα薬を用いた治療の間に前記第一の試料及び第二の試料の双方を得る、請求項２２～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記自己抗体がヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項２２～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
前記免疫抑制剤がメトトレキセート、アザチオプリン、それらの代謝産物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２３又は２４に記載の方法。
【請求項４１】
抗ＴＮＦα薬を有する又は有すると疑われる試料中の前記抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて前記標識されたＴＮＦαと前記抗ＴＮＦα薬との複合体を形成する工程と；
（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識されたＴＮＦα及び前記標識された内部標準を検出する工程と；
（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識されたＴＮＦαのピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の

前記プロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｅ）標識されたＴＮＦαの前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；
（ｆ）工程（ｃ）から得られる積分を工程（ｄ）から得られる積分で除することによって第二の比を決定する工程と；及び
（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを決定する工程と、
を含む、前記方法。

【請求項４２】
　工程（ｅ）において決定された第一の比が約８０～約１００である、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】
　工程（ｅ）において決定された第一の比が約１００である、請求項４１に記載の方法。

【請求項４４】
　前記標識された内部標準がＢｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８である、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】
　前記標識された内部標準の前記量が分析された試料１００μＬ当たり約１～約２５ｎｇである、請求項４１～４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６】
　抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する方法であって、以下の工程：
請求項４１～４４のいずれか一項に記載の方法による前記第一の比と第二の比との比較に基づいて前記被験者に対する前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を決定する工程と；
それによって、前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程と、
を含む、前記方法。

【請求項４７】
　以下の工程：
第一の比が約１００：１でありかつ第二の比が約９５：１より小さい場合に前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させ、それによって前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程、
をさらに含む、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】
　前記抗ＴＮＦα薬が、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】
　前記抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】
　前記抗ＴＮＦα薬がアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】
　前記抗ＴＮＦα薬がエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２】
　前記抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である、請求項

４１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記標識されたＴＮＦαがフルオロフォア標識されたＴＮＦαである、請求項４１～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記検出された標識された抗ＴＮＦα及び標識された内部標準を定量化する、請求項４１～５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
最初に前記複合体が、次いでフリーの標識されたＴＮＦαが溶出される、請求項４１～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記試料が血清である、請求項４１～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者から前記試料を得る、請求項４１～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記サイズ排除クロマトグラフィーがサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）である、請求項４１～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料中の前記自己抗体の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬と前記自己抗体との複合体を形成する工程と；
（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識された抗ＴＮＦα薬及び前記標識された内部標準を検出する工程と；
（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識された抗ＴＮＦα薬のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の前記プロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｅ）標識された抗ＴＮＦα薬の前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；及び
（ｆ）工程（ｃ）及び工程（ｄ）から得られる積分を除することによって第二の比を決定する工程と；及び
（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記自己抗体の存在又はレベルを決定する工程と、
を含む、前記方法。
【請求項６０】
工程（ｅ）において決定された第一の比が約８０～約１００である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
工程（ｅ）において決定された第一の比が約１００である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６２】
前記標識された内部標準がＢｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８である、請求項５９～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記標識された内部標準の前記量が分析された試料１００μＬ当たり約５０～約２００ｐｇである、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。

10
20
30
40
50

【請求項６４】
前記抗ＴＮＦα薬が、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
前記抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
前記抗ＴＮＦα薬がアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
前記抗ＴＮＦα薬がエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
前記検出された標識された抗ＴＮＦα及び標識された内部標準を定量化する、請求項５９～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
最初に前記複合体が、次いでフリーの標識された抗ＴＮＦα薬が溶出される、請求項５９～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
前記試料が血清である、請求項５９～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者から前記試料を得る、請求項５９～７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
前記サイズ排除クロマトグラフィーがサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）である、請求項５９～７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
前記自己抗体がヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項５９～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベル及び抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを測定するキットであって、以下：
（ａ）或る量の標識されたＴＮＦαを含む第一の測定基体と；
（ｂ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬を含む第二の測定基体と；
（ｃ）場合により、或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を含む第三の測定基体と；
（ｄ）場合により、或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を含む第四の測定基体と；
（ｅ）場合により、被験者から試料を抽出する手段と；及び
（ｆ）場合により、前記キットを使用するための取扱説明書と、
を含む、前記キット。
【請求項７６】
前記標識されたＴＮＦα、前記標識された抗ＴＮＦα薬、及び／又は前記標識された内部標準を検出する手段をさらに含む、請求項７５に記載のキット。

【請求項７７】
前記検出手段が蛍光標識検出、ＵＶ照射検出、又はヨウ素照射を含む、請求項７６に記載のキット。
【請求項７８】
サイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）装置をさらに含む、請求項７５～７７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項７９】
前記第一、第二、第三、及び第四の測定基体がニトロセルロース、シリカゲル、及びサイズ排除クロマトグラフ媒体からなる群から選択される、請求項７５～７８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８０】
前記抗ＴＮＦα薬がＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項７５～７９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８１】
前記標識されたＴＮＦαがフルオロフォア標識されたＴＮＦαである、請求項７５～８０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８２】
前記試料が血清である、請求項７５～８１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８３】
前記抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者から前記試料を得る、請求項７５～８２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８４】
前記自己抗体がヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである、請求項７５～８３のいずれか一項に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【関連出願の相互参照】
【０００１】
本願は、２００９年１０月２６日に出願された米国特許仮出願第６１／２５５，０４８号、２００９年１１月１９日に出願された米国特許仮出願第６１／２６２，８７７号、２０１０年４月１５日に出願された米国特許仮出願第６１／３２４，６３５号、２０１０年５月１７日に出願された米国特許仮出願第６１／３４５，５６７号、２０１０年６月３日に出願された米国特許仮出願第６１／３５１，２６９号、２０１０年１０月４日に出願された米国特許仮出願第６１／３８９，６７２号、及び２０１０年１０月１５日に出願された米国特許仮出願第６１／３９３，５８１号についての優先権を主張し、これらの開示内容は、あらゆる目的のためにこれらの全体が参照により本明細書中に組み込まれる。
【発明の背景】
【０００２】
自己免疫疾患は重要なかつ広がりを見せている医学的問題である。例えば、慢性関節リウマチ（ＲＡ）は米国で２００万人を超える人々を冒す自己免疫疾患である。ＲＡは関節の慢性炎症を引き起こすものであり、典型的には関節破壊及び機能的障害（functional disability）を引き起こす可能性を有する進行性の病気である。遺伝的素因、感染因子及び環境的要因はいずれもこの疾病の病因とされているが、慢性関節リウマチの原因は不明である。活動性ＲＡにおける症状として、疲労、食欲不振、微熱、筋肉痛、関節痛及びこわばりを挙げることができる。また、疾病の再燃時には、滑膜の炎症によって、関節が頻繁に赤くなり、腫れ、痛みそして圧痛を伴うようになる。さらに、ＲＡは全身性疾患であるので、炎症は、眼瞼腺（glands of the eyes）、口腔腺、肺粘膜、心膜、及び血管を含む、関節以外の体の領域及び器官に影響を与えることがある。

【０００３】
ＲＡ及び他の自己免疫疾患の管理のための従来的な治療として、即効性の「第一選択薬」及び遅効性の「第二選択薬」を挙げることができる。第一選択薬は痛み及び炎症を軽減する。かかる第一選択薬の例として、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、エトドラク及び他の非ステロイド系の抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、並びに経口的に投与されるか又は組織及び関節内に直接注射されるコルチコステロイドを挙げることができる。第二選択薬は、疾病の緩解を促進し進行性の関節破壊を防止するもので疾患修飾性抗リウマチ薬又はＤＭＡＲＤとも呼ばれる。第二選択薬の例として、金、ヒドロクロロキン、アザルフィジン及び免疫抑制薬、例えば、メトトレキセート、アザチオプリン、シクロホスファミド、クロラムブシル及びシクロスポリンなどを挙げることができるが、これらの薬剤は有害な副作用を有していることがある。従って、慢性関節リウマチ及び他の自己免疫疾患に対する別の治療法が探求されている。

【０００４】
腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）は、当初は所定のマウス腫瘍の壊死を誘発するその能力に基づいて同定された、単球及びマクロファージを含む、多くの細胞型によって産生されるサイトカインである。その後、悪液質（cachexia）に関連した、カケクチンと呼ばれる因子がＴＮＦ－αと一致することが示された。ＴＮＦ－αは、ショック（shock）、敗血症、感染、自己免疫疾患、ＲＡ、クローン病、移植片拒絶（transplant rejection）及び移植片対宿主病を含む、ヒトの種々の他の疾病及び疾患の病態生理に関与するとされている。

【０００５】
種々のヒトの疾患におけるヒトＴＮＦ－α（ｈＴＮＦ－α）の有害な役割のために、治療戦略は、ｈＴＮＦ－α活性を阻害又は抑制する（counteract）ように設計されてきた。とりわけ、ｈＴＮＦ－α活性を阻害する手段として、ｈＴＮＦ－αに結合しそれを中和する抗体が捜し求められてきた。かかる抗体の最も初期の一部は、ｈＴＮＦ－αで免疫されたマウスのリンパ球から調製したハイブリドーマによって分泌される、マウスモノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）であった（例えば、Ｍｏｅｌｌｅｒらに対する米国特許第５，２３１，０２４号参照）。これらのマウス抗ｈＴＮＦ－α抗体はしばしばｈＴＮＦ－αに対して高い親和性を示しそしてｈＴＮＦ－α活性を中和することができるが、一方で、それらのインビボの使用は、例えば、短い血清半減期、特定のヒトエフェクター機能の惹起（trigger）不能、及びヒトにおけるマウス抗体に対する望ましくない免疫応答の誘発（elicitation）（「ヒト抗マウス抗体」（ＨＡＭＡ）反応）などの、ヒトへのマウス抗体の投与に関連した問題によって制限されてきた。

【０００６】
ごく最近になって、生物学的療法が、例えば、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療に適用されている。例えば、４種のＴＮＦα阻害剤、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、キメラ抗ＴＮＦα mＡｂ、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＴＮＦＲ－Ｉｇ Ｆｃ融合タンパク質、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ヒト抗ＴＮＦα mＡｂ、及びＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、ペグ化Ｆａｂ断片は、ＦＤＡによって慢性関節リウマチの治療に対して承認されている。ＣＩＭＺＩＡ（商標）は、中等度から重症のクローン病（ＣＤ）の治療にも用いられる。かかる生物学的療法は慢性関節リウマチ及び例えば、ＣＤなどの、他の自己免疫疾患の治療における好結果が示されたが、一方で、かかる治療に対して、治療された全ての被検者が応答し又は充分に応答するわけではない。さらに、ＴＮＦα阻害剤の投与は、該薬剤に対する免疫応答を誘発しそして例えば、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）などの、自己抗体の産生を導くことがある。かかるＨＡＣＡ、ＨＡＨＡ、又はＨＡＭＡ免疫応答は、前記薬剤を用いたさらなる処理を不可能にする免疫療法ＴＮＦα阻害剤の薬物動態及び生体内分布における劇的変化及び過敏性反応（hypersensitive reaction）に関連していることがある。このように、当該技術分野では、患者試料中の抗ＴＮＦα生物学的製剤及び／又はそれらの自己抗体の

存在を検出してＴＮＦα阻害剤療法を監視し及び治療決定を誘導するアッセイが必要である。本発明は、この要求を満たしさらに関連した利点を提供する。
【発明の概要】
【０００７】
　ＴＮＦαは炎症性疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、悪性腫瘍、及び／又は神経変性疾患に関係するとされてきており、例えば、慢性関節リウマチ及びクローン病などの疾病における特定の生物学的療法についての有用な標的である。例えば、抗ＴＮＦα抗体などのＴＮＦα阻害剤は重要な種類の治療薬である。抗ＴＮＦα生物学的製剤及び／又はそれらの自己抗体の存在を検出するアッセイ方法が必要である。
【０００８】
　そこで、本発明は、１つの実施形態において、試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識されたＴＮＦαを抗ＴＮＦα薬を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、抗ＴＮＦα薬との標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、標識されたＴＮＦαと抗ＴＮＦα薬とは互いに共有結合していない）を形成する工程と；
（ｂ）標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して標識された複合体を（例えば、フリーの標識されたＴＮＦαから）分離する工程と；及び
（ｃ）標識された複合体を検出し、それによって抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを検出する工程と、
を含む、方法を提供する。
【０００９】
　或る場合に、この方法は、例えば、かかる抗ＴＮＦα薬療法を受けている被験者由来の、試料中のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、及びＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）のレベルを測定するのに有用である。
【００１０】
　別の実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬を該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料と接触させて自己抗体との標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、標識されたＴＮＦαと自己抗体とは互いに共有結合していない）を形成する工程と；
（ｂ）前記標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して標識された複合体を（例えば、フリーの標識された抗ＴＮＦα薬から）分離する工程と；及び
（ｃ）前記標識された複合体を検出し、それによって自己抗体の存在又はレベルを検出する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００１１】
　或る場合に、この方法は、例えば、抗ＴＮＦα薬療法を受けている被験者由来の、試料中の自己抗体であって、限定されないが、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を含む自己抗体のレベルを測定するのに有用である。
【００１２】
　さらに別の実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬及び標識されたＴＮＦαを該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と、標識されたＴＮＦαと、及び自己抗体との間の第一の標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、第一の標識された複合体の成分同士は互いに共

有結合していない）並びに標識された抗ＴＮＦα薬と自己抗体との間の第二の標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、第二の標識された複合体の成分同士は互いに共有結合していない）を形成し、ここで標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとは異なった標識を含んでいる工程と；
（ｂ）前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体を（例えば、フリーの標識されたＴＮＦα及びフリーの標識された抗ＴＮＦα薬から）分離する工程と；及び
（ｃ）前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体を検出し、それによって、前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体の双方が存在している場合には非中和型の自己抗体の存在又はレベルを検出し（すなわち、自己抗体は抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を干渉しない）、そして前記第二の標識された複合体のみが存在している場合には中和型の自己抗体の存在又はレベルを検出する（すなわち、自己抗体は抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を干渉する）工程と、
を含む、前記方法を提供する。
【００１３】
　或る場合に、この方法は、例えば、抗ＴＮＦα薬療法を受けている被験者由来の、試料中の自己抗体であって、限定されないが、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を含む自己抗体のレベルを測定するのに有用である。
【００１４】
　関連した実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬を該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と自己抗体との間の第一の標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、標識された抗ＴＮＦα薬と自己抗体とは互いに共有結合していない）を形成する工程と；
（ｂ）前記第一の標識された複合体を第一のサイズ排除クロマトグラフィーに付して前記第一の標識された複合体を（例えば、フリーの標識された抗ＴＮＦα薬から）分離する工程と；及び
（ｃ）前記第一の標識された複合体を検出し、それによって自己抗体の存在又はレベルを検出する工程と、
（ｄ）標識されたＴＮＦαを前記第一の標識された複合体と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとの間の第二の標識された複合体（すなわち、免疫複合体又はイムノコンジュゲート）（すなわち、標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとは互いに共有結合していない）を形成し、ここで標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとは異なった標識を含んでいる工程と；
（ｅ）前記第二の標識された複合体を第二のサイズ排除クロマトグラフィーに付して前記第二の標識された複合体を（例えば、フリーの標識されたＴＮＦαから）分離する工程と；及び
（ｆ）前記第二の標識された複合体を検出し、それによって中和型の自己抗体の存在又はレベルを検出する（すなわち、自己抗体は抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を干渉する）工程と、
を含む、方法を提供する。
【００１５】
　或る場合に、この方法は、例えば、抗ＴＮＦα薬療法を受けている被験者由来の、試料中の自己抗体であって、限定されないが、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を含む自己抗体のレベルを測定するのに有用である。
【００１６】

別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者に対する前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）前記被験者由来の第一の試料中の前記抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第一の試料を或る量の標識されたＴＮＦαと接触させて該標識されたＴＮＦαを前記抗ＴＮＦα薬と共に含む第一の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第一の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルを測定する工程と、
を含む工程と；
（ｂ）前記被験者由来の第二の試料中の前記抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第二の試料を或る量の標識された抗ＴＮＦα薬と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬を前記自己抗体と共に含む第二の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第二の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって前記自己抗体の前記レベルを測定する工程と、
を含む工程と；及び
（ｃ）工程（ａ）において測定された前記抗ＴＮＦα薬のレベルから工程（ｂ）において測定された前記自己抗体のレベルを減算し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００１７】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における前記抗ＴＮＦα薬の有効量を最適化する方法であって、以下の工程：
（ａ）本発明の方法に従って前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と；
（ｂ）前記抗ＴＮＦα薬の前記有効量を前記抗ＴＮＦα薬の前記レベルと比較する工程と；及び
（ｃ）工程（ｂ）の比較に基づいて前記被験者に対する前記抗ＴＮＦα薬の今後の用量を決定し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程と、
を含む、前記方法を提供する。
【００１８】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における治療を最適化し及び／又は前記抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する方法であって、
（ａ）前記被験者由来の第一の試料中の前記抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程と；
（ｂ）前記被験者由来の第二の試料中の前記抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程と；及び
（ｃ）前記抗ＴＮＦα薬及び前記自己抗体のレベルに基づいて前記被験者に対する今後の治療過程を決定し、それによって治療を最適化し及び／又は前記抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する工程、
を含む、方法を提供する。
【００１９】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を有する又は有すると疑われる試料中の該抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、
（ａ）或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて標識されたＴＮＦαと前記抗ＴＮＦα薬との複合体を形成する工程と；
（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識されたＴＮＦα及び前記標識された内部標準を検出する工程と；
（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識されたＴＮＦαのピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の前記プロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と

10

20

30

40

50

；
（ｅ）標識されたＴＮＦαの前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；
（ｆ）工程（ｃ）から結果として得られた積分を工程（ｄ）から結果として得られた積分で除することによって第二の比を決定する工程と；及び
（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを決定する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００２０】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する方法であって：前段落の工程（ｅ）の標識されたＴＮＦα対標識された内部標準の比の、前段落の工程（ｆ）の標識されたＴＮＦα対標識された内部標準の比との比較に基づいて被験者に対する抗ＴＮＦα薬の今後の用量を決定し、それによって抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程を含む、方法を提供する。
【００２１】
或る実施形態において、本発明は、自己抗体を有する又は有すると疑われる試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬と前記自己抗体との複合体を形成する工程と；
（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識された抗ＴＮＦα薬及び前記標識された内部標準を検出する工程と；
（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識された抗ＴＮＦα薬のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｅ）標識された抗ＴＮＦα薬の前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；及び
（ｆ）工程（ｃ）及び工程（ｄ）から結果として得られた積分を除する（dividing the resultant integration from step (c) and (d)）ことによって第二の比を決定する工程と；及び
（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記自己抗体の存在又はレベルを決定する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００２２】
別の実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベル及び抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを測定するキットであって、以下：
（ａ）或る量の標識されたＴＮＦαを含む第一の測定基体（substrate）と;
（ｂ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬を含む第二の測定基体と；
（ｃ）場合により、或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を含む第三の測定基体と；
（ｄ）場合により、或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を含む第四の測定基体と；
（ｅ）場合により、被験者から試料を抽出する手段と；及び
（ｆ）場合により、前記キットを使用するための取扱説明書（pamphlet of instructions）と、
を含む、キットを提供する。

【００２３】
　本発明の他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から当業者に明白となるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】サイズ排除ＨＰＬＣを用いてＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$とＨＵＭＩＲＡ（商品名）との間の結合を検出する、本発明のアッセイの典型的な実施形態を示す図である。
【００２５】
【図２】ＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$へのＨＵＭＩＲＡ（商品名）の結合の用量反応（dose response）曲線を示す図である。
【００２６】
【図３】架橋（bridging）アッセイとして知られる、現在のＥＬＩＳＡをベースとしたＨＡＣＡレベルの測定法を示す図である。
【００２７】
【図４】ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）に対して産生されたＨＡＣＡ／ＨＡＨＡの濃度を測定するための本発明の自己抗体検出アッセイの典型的な概略を示す図である。
【００２８】
【図５】ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ヒトＩｇＧ抗体結合の用量反応分析を示す図である。
【００２９】
【図６】ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ヒトＩｇＧ抗体結合の第二の用量反応分析を示す図である。
【００３０】
【図７】ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ヒトＩｇＧ抗体結合の用量反応曲線を示す図である。
【００３１】
【図８】正常なヒト血清及びＨＡＣＡ陽性血清におけるＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$免疫複合体形成を示す図である。
【００３２】
【図９】本発明のモビリティシフトアッセイ又は架橋アッセイを用いて実施した２０の患者血清試料からのＨＡＣＡ測定の要約を提供する図である。
【００３３】
【図１０】本発明の新規なＨＡＣＡアッセイに対する現行のＨＡＣＡ血清濃度測定法の比較及び要約を提供する図である。
【００３４】
【図１１】正常（ＮＨＳ）又はＨＡＣＡ陽性（ＨＰＳ）血清とインキュベートしたフルオロフォア（Ｆｌ）標識されたＩＦＸのＳＥ－ＨＰＬＣプロファイルを示す図である。インキュベーション混合物へのＨＡＣＡ陽性血清の増量の添加は用量依存的に高分子量（higher molecular mass）溶出位置Ｃ１及びＣ２へＩＦＸ－Ｆｌピークをシフトさせた。
【００３５】
【図１２】モビリティシフトアッセイによって決定された、ＨＡＣＡ陽性血清の希釈度の増加に伴って生成された結合及びフリーのＩＦＸ－Ｆｌの用量反応曲線を示す図である。（Ａ）増加希釈度のＨＡＣＡ陽性血清をＩＦＸ－Ｆｌ　３７．５ｎｇとインキュベートした。希釈度を高める（ＨＡＣＡが減少する）につれて、ＳＥ－ＨＰＬＣ分析においてフリーのＩＦＸ－Ｆｌが増加することが見出された。（Ｂ）増加希釈度のＨＡＣＡ陽性血清をＩＦＸ－Ｆｌ　３７．５ｎｇとインキュベートした。希釈度を高める（ＨＡＣＡが減少する）につれて、ＳＥ－ＨＰＬＣ分析においてＨＡＣＡ結合したＩＦＸ－Ｆｌが減少することが見出された。
【００３６】
【図１３】正常（ＮＨＳ）の又はＩＦＸスパイクされた血清とインキュベートしたＴＮＦ

10
20
30
40
50

α－Ｆｌ のＳＥ－ＨＰＬＣプロファイルを示す図である。インキュベーション混合物へのＩＦＸスパイク血清の増量の添加は用量依存的に高分子量溶出位置へ蛍光ＴＮＦαピークをシフトさせた。

【００３７】

【図１４】モビリティシフトアッセイによって決定された、ＩＦＸスパイク血清の希釈度の増加に伴って生成された結合及びフリーのＴＮＦαの用量反応曲線を示す図である。インキュベーション混合物に添加したＩＦＸの濃度の増加につれてフリーＴＮＦαの百分率が減少するが結合ＴＮＦαの百分率は増加する。

【００３８】

【図１５】モビリティシフトアッセイによる種々の時点におけるＩＦＸで治療されたＩＢＤ患者における相対的ＨＡＣＡレベル及びＩＦＸ濃度の測定値を示す図である。

10

【００３９】

【図１６】患者管理－種々の時点におけるＩＦＸで治療されたＩＢＤ患者の血清中のＨＡＣＡレベル及びＩＦＸ濃度の測定値を示す図である。

【００４０】

【図１７】（Ａ）非中和性又は（Ｂ）中和性の自己抗体、例えば、ＨＡＣＡなど、の存在を検出する本発明のアッセイの典型的な実施形態を示す図である。

【００４１】

【図１８】中和性自己抗体、例えば、ＨＡＣＡなど、の存在を検出する本発明のアッセイの代替的な実施形態を示す図である。

20

【００４２】

【図１９】種々の量の抗ヒトＩｇＧの存在下で正常ヒト血清（ＮＨＳ）とインキュベートしたＦｌ標識されたＡＤＬのモビリティシフトプロファイルを示す図である。インキュベーション混合物への抗ヒトＩｇＧの増量の添加は用量依存的に高分子量溶出位置Ｃ１及びＣ２へフリーＦｌ－ＡＤＬピーク（ＦＡ）をシフトさせたが、内部標準（ＩＣ）は変化しなかった。

【００４３】

【図２０】フリーのＦｌ－ＡＤＬのシフトに関する抗ヒトＩｇＧの用量反応曲線を示す図である。増量の抗ヒトＩｇＧをＦｌ－ＡＤＬ　３７．５ｎｇ及び内部標準とインキュベートした。反応混合物への抗体の添加量が増えれば増えるほど、内部標準に対するフリーＦｌ－ＡＤＬの比は低下した。

30

【００４４】

【図２１】種々の量のＡＤＬの存在下に正常ヒト血清（ＮＨＳ）とインキュベートしたＦｌ標識されたＴＮＦαのモビリティシフトプロファイルを示す図である。Ｅｘ＝４９４ｎｍ；Ｅｍ＝５１９ｎｍ。インキュベーション混合物へのＡＤＬの増量の添加は、用量依存的に高分子量溶出位置へＴＮＦ－Ｆｌピーク（ＦＴ）をシフトさせたが、内部標準（ＩＣ）は変化しなかった。

【００４５】

【図２２】フリーのＴＮＦ－α－Ｆｌのシフトに関するＡＤＬの用量反応曲線を示す図である。増量のＡＤＬをＴＮＦ－α－Ｆｌ　１００ｎｇ及び内部標準とインキュベートした。反応混合物への抗体ＡＤＬの添加量が増えれば増えるほど、内部標準に対するフリーＴＮＦ－α－Ｆｌの比は低下した。

40

【００４６】

【図２３】正常の（ＮＨＳ）又はプールＨＡＣＡ陽性患者血清とインキュベートしたＦｌ標識されたＲｅｍｉｃａｄｅ（ＩＦＸ）のモビリティシフトプロファイルを示す図である。

【００４７】

【図２４】正常の（ＮＨＳ）又はマウス抗ヒトＩｇＧ１抗体とインキュベートしたＦｌ標識されたＨＵＭＩＲＡ（ＡＤＬ）のモビリティシフトプロファイルを示す図である。

【００４８】

50

【図２５】正常の（ＮＨＳ）又はプールＨＡＨＡ陽性患者血清とインキュベートしたＦｌ標識されたＨＵＭＩＲＡ（ＡＤＬ）のモビリティシフトプロファイルを示す図である。
【発明の詳細な記載】
【００４９】
Ｉ．序論
本発明は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いたホモジニアスモビリティシフトアッセイがＴＮＦα阻害剤並びにそれらに対して産成される自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ、ＨＡＨＡなど）の存在又はレベルを測定するのにとりわけ有利であるという発見に一部基づいている。とりわけ、本発明はいかなる洗浄工程も必要としない「ミックスアンドリード（mix and read）」アッセイを提供する。結果として、複合及び非複合のタンパク質治療薬が容易に相互に分離される。さらに、本発明のアッセイを用いてフリーの薬剤に由来する任意の可能性のある干渉が最小化される。対照的に、ＨＡＣＡ又はＨＡＨＡレベルを測定する典型的なＥＬＩＳＡは、最大で３ヶ月かかることがあるが、体内からＴＮＦα阻害剤が除去されるまで実施することができない。さらに、本発明は、抗ＴＮＦα抗体のほかにも一般に広範囲のタンパク質治療薬に適用することができる。本発明のアッセイはまた、固体表面への抗原の結合を回避し、無関係のＩｇＧ類の非特定的結合を排除し、弱い親和性で抗体を検出し、そして現在利用することができる検出法、例えば、エンザイムイムノアッセイなどより高い感度及び特異性を示すので、有利である。
【００５０】
抗ＴＮＦα生物学的製剤並びに他の免疫治療薬の血清濃度を測定することの重要性は、臨床試験のときに薬物動態性及び忍容性（例えば、免疫応答）試験を実施すべきことをＦＤＡが要求している事実によって示される。本発明は、これらの薬剤を受けている患者を監視して、患者が適正な用量を得ていること、その薬剤が体内からあまりに急速に除去されるものでないこと、及び患者がその薬剤に対して免疫応答を発現していないことを確かめるのにも有用である。さらに、本発明は、初期薬剤で不首尾のための異なった薬剤間での切り替えを導くのに有用である。
【００５１】
ＩＩ．定義
本明細書中で用いる場合、以下の用語は他に断らない限りそれらに与えられた意味を有する。
【００５２】
用語「抗ＴＮＦα薬」又は「ＴＮＦα阻害剤」は、本明細書中で用いる場合、例えば、ＴＮＦαとＴＮＦαに対する細胞表面受容体との相互作用を阻害すること、ＴＮＦαタンパク質産生を阻害すること、ＴＮＦα遺伝子発現を阻害すること、細胞からのＴＮＦα分泌を阻害すること、ＴＮＦα受容体シグナル伝達を阻害すること又は被験者にＴＮＦα活性の低下を生じさせる任意の他の手段などによって、直接的に又は間接的にＴＮＦα活性を阻害する、タンパク質、抗体、抗体断片、融合タンパク質（例えば、Ｉｇ融合タンパク質又はＦｃ融合タンパク質)、多価結合タンパク質（例えば、ＤＶＤ Ｉｇ）、小分子ＴＮＦαアンタゴニスト及び類似の天然に存在する若しくは非天然に存在する分子、及び／又は組換え体及び／又はその操作型形態（engineered forms）を含む薬剤を包含するように意図される。用語「抗ＴＮＦα薬」又は「ＴＮＦα阻害剤」は、好ましくは、ＴＮＦα活性を阻害する薬剤を含む。ＴＮＦα阻害剤の例として、エタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名）、Ａｍｇｅｎ社）、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、Ｊｏｈｎｓｏｎ ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ社）、ヒト抗ＴＮＦモノクローナル抗体アダリムマブ（Ｄ２Ｅ７／ＨＵＭＩＲＡ（商品名）、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）、セルトリズマブ ペゴル（ＣＩＭＺＩＡ（商標）、ＵＣＢ社）、ＣＤＰ ５７１（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ社）、及びＣＤＰ ８７０（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ社）並びにＴＮＦα活性が有害である疾患（例えば、ＲＡ）を患っている又は患うリスクのある被験者に投与した場合にその疾患が治療されるような、ＴＮＦα活性を阻害する他の化合物を挙げることができる。
【００５３】

用語「ＴＮＦα阻害剤に対する応答性を予測する」は、本明細書中で用いる場合、ＴＮＦα阻害剤を用いた被験者の治療がその被験者に有効である（例えば、測定可能な利益を与える）か否かの可能性を評価する能力を指すものとする。とりわけ、治療が有効であるか否かの可能性を評価する前記能力は、典型的には、治療が始まり、そして有効性の指標（例えば、測定可能な利益の指標）が被験者において観察された後に発揮される。とりわけ好ましいＴＮＦα阻害剤は、ＴＮＦα媒介性の疾病又は疾患、例えば、慢性関節リウマチ、又は炎症性腸疾患（ＩＢＤ）など、の治療においてヒトに用いるのにＦＤＡによって承認されている生物学的製剤であり、それらの製剤として、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））、エタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））、及びセルトリズマブ ペゴル（ＣＩＭＺＩＡ（商標）、ＵＣＢ社）を挙げることができる。

【００５４】

用語「サイズ排除クロマトグラフィー」（ＳＥＣ）は、溶液中の分子をそれらのサイズ及び／又は流体力学的体積（hydrodynamic volume）に基づいて分離するクロマトグラフ法を含むものとする。それは、例えば、タンパク質及びそのコンジュゲートなどの、の大分子又は高分子複合体（macromolecular complexes）に適用される。典型的には、水溶液を用いてカラムを通して試料を運ぶ（transport）場合の技術がゲル濾過クロマトグラフィーとして知られている。

【００５５】

用語「複合体」、「免疫複合体」、「コンジュゲート」及び「イムノコンジュゲート」は、限定的でなく、抗ＴＮＦα薬に結合したＴＮＦα（例えば、非共有手段による）、抗ＴＮＦα薬に対する抗体に結合した抗ＴＮＦα薬（例えば、非共有手段による）、及び抗ＴＮＦα薬に対する抗体及びＴＮＦαの双方に結合した抗ＴＮＦα薬（例えば、非共有手段による）を含む。

【００５６】

本明細書中で用いる場合、用語「標識された」によって修飾された実体（entity）は、任意の実体、分子、タンパク質、酵素、抗体、抗体断片、サイトカイン、又は経験的に検出可能である別の分子若しくは化学的実体とコンジュゲートされる関連した種類（specie）を含む。標識された実体の標識として適切な化学種は、限定的でなく、蛍光色素、例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）色素、例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７など、量子ドット（quantum dots）、光学色素、発光色素、及び放射性核種、例えば、^{125}Ｉ、を含む。

【００５７】

用語「有効量」は、治療効果を必要とする被験者においてその治療効果を達成することができる薬剤の用量並びに物質の生体利用可能量（bioavailable amount）を含む。用語「生体利用可能」は、薬剤の投与された用量の治療活性に利用することができる部分を含む。例えば、ＴＮＦαが病態生理に関与するとされている疾病及び疾患、例えば、限定的でなく、ショック、敗血症、感染、自己免疫疾患、ＲＡ、クローン病、移植片拒絶及び移植片対宿主病、を治療するのに有用な薬剤の有効量は、それと関連した１つ又は２つ以上の症状を予防し又は軽減することができる量であることができる。

【００５８】

語句「曲線下面積」は、二次元プロットの一部分の積分を説明するのに用いられる数学的技術用語である。例えば、サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットにおいて、プロットにおける種々のピークは特定の分子の検出を示す。これらのピークの積分は、最小ｙ軸値、例えば、二次元プロットのベースラインによって囲まれ（circumscribed）、かつ二次元プロット自体によって囲まれた面積を含む。ピークの積分は、次の計算式、曲線下面積＝$\int_a^b f(x)\,dx$（式中、ｆ（ｘ）は二次元プロットを描く関数であり、そして変数「ａ」及び「ｂ」は積分されるピークのｘ軸両端（x-axis limits）を示す）によっても等しく説明される。

【００５９】

語句「蛍光標識検出」は、蛍光標識を検出する手段を含む。検出手段として、限定的でなく、分光計、蛍光光度計、光度計、一般にクロマトグラフィー機器と一体となっている検出装置、例えば、限定的でなく、サイズ排除－高速液体クロマトグラフィーなど、例えば、限定的でなく、Ａｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムなど、を挙げることができる。

【００６０】

大括弧「［　］」は、その大括弧内の種類をその濃度によって表していることを示す。

【００６１】

語句「治療を最適化する」は、用量（例えば、有効量又はレベル）及び／又は特定の治療の型を最適化することを含む。例えば、抗ＴＮＦα薬の用量を最適化することは、次に被験者に投与される抗ＴＮＦα薬の量を増量又は減量することを含む。或る場合に、抗ＴＮＦα薬の型を最適化することは、投与される抗ＴＮＦα薬を或る薬剤から異なる薬剤（例えば、異なる抗ＴＮＦα薬）に変更することを含む。或る他の場合に、治療を最適化することは、或る用量の（例えば、増量した、減量した、又は前の用量と同量の）抗ＴＮＦα薬を免疫抑制薬と組み合わせて同時投与することを含む。

【００６２】

用語「同時投与する」は、或る活性薬剤の生理学的効果の期間が第二の活性薬剤の生理学的効果と重なるように、２種以上の活性薬剤を投与することを含む。

【００６３】

用語「被験者」、「患者」、又は「個体」は典型的には、ヒトを指すが、例えば、他の霊長類、齧歯類、イヌ科動物、ネコ科動物、ウマ科動物、ヒツジ科動物、ブタ科動物などを含む他の動物も指す。

【００６４】

用語「治療過程」は、ＴＮＦα媒介性の疾病又は疾患と関連した１つ又は２つ以上の症状を軽減又は予防するように取られる任意の治療的アプローチを含む。この用語は、ＴＮＦα媒介性の疾病又は疾患を伴う個体の健康を改善するのに有効な任意の化合物の投与、薬剤、手順、及び／又はレジメンを包含し、そして本明細書中に記載の任意の治療薬を含む。当業者であれば、抗ＴＮＦα薬及び／又は該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又は濃度レベルに基づいて、治療過程又は目下の治療過程の用量を変更（例えば、増量又は減量）することができることは理解されよう。

【００６５】

用語「免疫抑制薬」又は「免疫抑制剤」は、照射によるように又は薬剤、例えば、代謝拮抗薬、抗リンパ球血清、抗体など、の投与によるように、免疫抑制効果、例えば、免疫応答の防止又は減少、を生成することができる任意の物質を含む。適当な免疫抑制薬の例として、限定的でなく、チオプリン薬、例えば、アザチオプリン（ＡＺＡ）及びその代謝産物など；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキセート（ＭＴＸ）など；シロリムス（ラパマイシン）；テムシロリムス；エベロリムス；タクロリムス（ＦＫ－５０６）；ＦＫ－７７８；抗リンパ球グロブリン抗体、抗胸腺細胞グロブリン抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ４抗体、及び抗体－毒素コンジュゲート；シクロスポリン；ミコフェノレート；ミゾリビンモノホスフェート；スコパロン；酢酸グラチラマー；それらの代謝産物；それらの薬剤学的に許容することのできる塩；それらの誘導体；それらのプロドラッグ；及びそれらの組み合わせを挙げることができる。

【００６６】

用語「チオプリン薬」は、アザチオプリン（ＡＺＡ）、６－メルカプトプリン（６－ＭＰ）、又は治療有効性を有するそれらの任意の代謝産物を含み、限定的でなく、６－チオグアニン（６－ＴＧ）、６－メチルメルカプトプリンリボシド、６－チオイノシンヌクレオチド（例えば、６－チオイノシンモノホスフェート、６－チオイノシンジホスフェート、６－チオイノシントリホスフェート）、６－チオグアニンヌクレオチド（例えば、６－チオグアノシンモノホスフェート、６－チオグアノシンジホスフェート、６－チオグアノシントリホスフェート）、６－チオキサントシンヌクレオチド（例えば、６－チオキサン

トシンモノホスフェート、６－チオキサントシンジホスフェート、６－チオキサントシントリホスフェート）、それらの誘導体、それらのアナログ、及びそれらの組み合わせを含む。

【００６７】

用語「試料」は個体から得られる任意の生物学的検体を含む。本発明に用いるのに適当な試料として、限定的でなく、全血、血漿、血清、唾液、尿、便、涙液、他の任意の体液、組織試料（例えば、生検）、及びその細胞抽出物（例えば、赤血球細胞抽出物）を挙げることができる。好ましい実施形態において、試料は血清試料である。当業者であれば、分析前に試料、例えば、血清試料など、を希釈することができることは理解されよう。或る場合に、用語「試料」は、限定的でなく、血液、体組織、血清、リンパ液、リンパ節組織、脾臓組織、骨髄、又は１種又は２種以上のこれらの組織に由来するイムノグロブリン富化画分を含む。或る他の場合に、用語「試料」は血清を含み又は血清若しくは血液由来のイムノグロブリン富化画分である。或る場合に、用語「試料」は体液を含む。

【００６８】

ＩＩＩ．実施形態の記載

本発明の方法の工程は、必ずしも、本発明の方法を提示する特定の順序で実施しなければならないというものではない。当業者であれば、本発明の方法の工程の他の順序付けが本発明の範囲内に包含されることを理解されよう。

【００６９】

或る実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：

（ａ）標識されたＴＮＦαを抗ＴＮＦα薬を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、抗ＴＮＦα薬との標識された複合体を形成する工程と；

（ｂ）前記標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して前記標識された複合体を分離する工程と；及び

（ｃ）前記標識された複合体を検出し、それによって抗ＴＮＦα薬を検出する工程と、

を含む、前記方法を提供する。

【００７０】

或る場合に、本発明の方法は、以下の抗ＴＮＦα抗体：ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、及びＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）に対してとりわけ有用である。

【００７１】

腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）は、全身性炎症に関与するサイトカインでありそして急性期反応を刺激する一群のサイトカインのメンバーである。ＴＮＦαの主要な役割は、免疫細胞の調節にある。ＴＮＦαはアポトーシス細胞死を誘導し、炎症を誘発し、及び腫瘍形成及びウイルス複製を阻害することもできる。ＴＮＦは主に、安定なホモトリマーに配列された２１２アミノ酸長のＩＩ型膜貫通タンパク質として産生される。

【００７２】

用語「ＴＮＦ－α」は、本明細書中で用いる場合、１７ｋＤａ分泌型及び２６ｋＤａ膜結合型として存在するヒトサイトカインを含むことを意図し、その生物学的に活性な型は非共有結合で結合した１７ｋＤａ分子の三量体からなる。ＴＮＦ－αの構造は、例えば、Jones, et al. (1989) Nature, 338:225-228にさらに記載されている。用語ＴＮＦαは、ヒト、組換えヒトＴＮＦ－α（ｒｈＴＮＦ－α）、又はヒトＴＮＦαタンパク質に対する少なくとも約８０％の同一性を含むことを意図する。ヒトＴＮＦαは、３５アミノ酸（ａａ）細胞質ドメイン、２１ａａ膜貫通セグメント、及び１７７ａａ細胞外ドメイン（ＥＣＤ）からなる（Pennica, D. et al. (1984) Nature 312:724）。ＥＣＤ内で、ヒトＴＮＦαは、アカゲザルＴＮＦαと９７％のａａ配列同一性を及びウシ科動物、イヌ科動物、コットンラット、ウマ科動物、ネコ科動物、マウス、ブタ科動物、及びラットＴＮＦαと７１％９２％のａａ配列相同性を共有する。ＴＮＦαは、標準的な組換え発現方法によって

調製することも又は商業的に購入することもできる（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社、カタログ番号２１０－ＴＡ、ミネソタ州ミネアポリス）。

【００７３】

或る実施形態において、「ＴＮＦ－α」は、抗ＴＮＦ－α抗体が結合することのできる分子又は分子の一部である「抗原」である。ＴＮＦ－αは１つ又は２つ以上のエピトープを有していることがある。或る場合に、ＴＮＦ－αは、高度に選択的な方法で、抗ＴＮＦ－α抗体と反応する。本発明の抗体、本発明の抗ＴＮＦ抗体の断片及び領域に結合する好ましい抗原は、配列番号１の少なくとも５つのアミノ酸を含む。或る場合に、ＴＮＦ－αは、抗ＴＮＦ－α抗体、その断片及び領域に結合することのできるＴＮＦαのエピトープを有する充分な長さである。

【００７４】

或る実施形態において、抗ＴＮＦ－α抗体、その断片及び領域に結合する充分な長さのエピトープを有するＴＮＦ－αの長さは、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２０５、２１０、２１５、２２０のアミノ酸の長さである。１つの実施形態において、用いられるＴＮＦ－αは配列番号１の残基７７－２３３を含む。

【００７５】

或る場合に、ＴＮＦ－αの可溶性部分、すなわち、配列番号１の残基７７－２３３、の少なくとも１つのアミノ酸を標識する。或る場合には、アミン反応性フルオロフォア誘導体を用いる。ほとんどの場合、アミン反応性基は、アミンとの反応時にカルボキサミド、スルホンアミド又はチオ尿素を形成するアシル化剤である。実質的には、全てのタンパク質がリシン残基を有しており、そして大部分がN末端に遊離のアミンを有しているので標識に対する結合点として用いることができる。好ましい実施形態において、残基７７が標識され、そして用いられるＴＮＦ－αが配列番号１の残基７７－２３３を含む。他の実施形態において、多くの第一アミンを標識してＴＮＦ－αを多重に標識する。

【００７６】

或る場合に、ＴＮＦ－αの一部、すなわち、抗体、及びその断片及び領域によって認識される部分、は標識しない。言い換えると、ＴＮＦ－α抗原の所定の部分は、抗ＴＮＦ活性、抗体、及びその断片、及び可変領域（variable regions）によって認識され、及び／又はそれらと結合するＴＮＦの立体的（topographical）又は三次元エピトープを備えている。これらの部分は、好ましくは、自由に結合できる状態にあり、従って標識されない。これらは、配列番号：１の残基１３６－１５７及び１６４－１８５を含む。

【００７７】

Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile；及び

【００７８】

Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly。

【００７９】

種々の検出可能な基（１つ又は複数）を用いてＴＮＦα又は抗ＴＮＦα薬を標識することができる。好ましくは、フルオロフォア又は蛍光色素を用いてＴＮＦα又は抗ＴＮＦα薬を標識する。本発明に用いるのに適切な典型的フルオロフォアは、参照により本明細書中に組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｃａｔａｌｏｇｕｅにリストされているものを含む（R. Haugland, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th Edition, Molecular probes, Inc. (2005)参照）。かかる典型的なフルオロフォアとして、限定的でなく、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）色素、例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）３５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４０５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４３０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８、Ａｌｅ

ｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５１４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５３２、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５５５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６１０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６３５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６６０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）６８０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）７００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）７５０、及び／又はＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）７９０、並びに他のフルオロフォア、例えば、塩化ダンシル(Dansyl Chloride)（ＤＮＳ－Ｃｌ）、５－（ヨードアセトアミダ）フルオロセイン(5-(iodoacetamida)fluoroscein)（５－ＩＡＦ）、フルオロセイン５－イソチオシアネート(ＦＩＴＣ)、テトラメチルローダミン５－（及び６－）イソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、６－アクリロイル－２－ジメチルアミノナフタレン（アクリロダン）、７－ニトロベンゾー２－オキサー１，３－ジアゾール－４－イルクロリド（ＮＢＤ－Ｃｌ）、臭化エチジウム、ルシファーイエロー（Lucifer Yellow）、５－カルボキシローダミン６Ｇヒドロクロリド、リサミンローダミンＢ塩化スルホニル、Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ（商標）塩化スルホニル、ＢＯＤＩＰＹ（商標）、ナフタルアミンスルホン酸（例えば、１－アニリノナフタレン－８－スルホン酸（ＡＮＳ）、６－（ｐ－トルイジニル）ナフタレン－２－スルホン酸（ＴＮＳ）など）、アントロイル脂肪酸（Anthroyl fatty acid）、ＤＰＨ、パリナリン酸、ＴＭＡ－ＤＰＨ、フルオレニル脂肪酸、フルオレセイン－ホスファチジルエタノールアミン、Ｔｅｘａｓ ｒｅｄ－ホスファチジルエタノールアミン、ピレニル－ホスファチジルコリン、フルオレニル－ホスホチジルコリン、メロシアニン（Merocyanine）５４０、１－（３－スルホナトプロピル）－４－［β－［２－［（ジ－ｎ－ブチルアミノ）－６－ナフチル］ビニル］ピリジニウムベタイン（ナフチルスチリル）、３，３’ジプロピルチアジカルボシアニン（ジＳ－Ｃ$_3$－（５））、４－（ｐ－ジペンチルアミノスチリル）－１－メチルピリジニウム（ジ－５－ＡＳＰ）、Ｃｙ－３ヨードアセトアミド、Ｃｙ－５－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｃｙ－７－イソチオシアネート、ローダミン８００、ＩＲ－１２５、チアゾールオレンジ、アズールＢ、ナイルブルー、Ａｌフタロシアニン、オキサキシン－１，４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）、ヘキスト３３３４２、ＴＯＴＯ、アクリジンオレンジ、エチジウムホモダイマー、Ｎ－（エトキシカルボニルメチル）－６－メトキシキノリニウム（ＭＱＡＥ）、フラー２、カルシウムグリーン、カルボキシＳＮＡＲＦ－６、ＢＡＰＴＡ、クマリン、フィトフルオル（phytofluors）、コロネン、金属配位子錯体、ＩＲＤｙｅ（商標）７００ＤＸ、ＩＲＤｙｅ（商標）７００、ＩＲＤｙｅ（商標）８００ＲＳ、ＩＲＤｙｅ（商標）８００ＣＷ、ＩＲＤｙｅ（商標）８００、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、ＤＹ６７６、ＤＹ６８０、ＤＹ６８２、ＤＹ７８０、及びそれらの混合物などを挙げることができる。追加の適切なフルオロフォアとして、酵素補因子、ランタニド、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、又はそれらの突然変異体及び誘導体を挙げることができる。本発明の１つの実施形態において、特異的な結合対の第二のメンバーはそこに結合された検出可能な基を有している。

【００８０】

　典型的には、蛍光基は、ポリメチン、フタロシアニン（pthalocyanines）、シアニン、キサンテン、フルオレン、ローダミン、クマリン、フルオレセイン及びＢＯＤＩＰＹ（商標）を含む色素のカテゴリーから選択されるフルオロフォアである。

【００８１】

　１つの実施形態において、蛍光基は、約６５０～約９００ｎｍの範囲で発光する近赤外（ＮＩＲ）フルオロフォアである。近赤外フルオロフォア技術の使用は、その技術が生体基質（biosubstrates）の自己蛍光由来のバックグランドを実質的に除去又は低減するので、生物学的アッセイにおいて有利である。近ＩＲ蛍光技術の別の利点は、励起光源からの散乱光の散乱強度が波長の逆４乗に比例するので、該散乱光が大きく低減されることである。低いバックグランド蛍光及び低い散乱は、高感度検出に必須である高いシグナル対ノイズ比をもたらす。さらに、生物学的組織における近ＩＲ領域（６５０ｎｍ～９００ｎ

ｍ）の光学的透明窓は、生物学的構成要素を通る光の透過を必要とするインビボイメージング及び細胞内検出に対してＮＩＲ蛍光を有用な技術にしている。この実施形態の側面において、蛍光基は、好ましくは、ＩＲＤｙｅ（商標）７００ＤＸ、ＩＲＤｙｅ（商標）７００、ＩＲＤｙｅ（商標）８００ＲＳ、ＩＲＤｙｅ（商標）８００ＣＷ、ＩＲＤｙｅ（商標）８００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６６０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６８０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）７００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）７５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）７９０、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、ＤＹ　６７６、ＤＹ６８０、ＤＹ６８２及びＤＹ７８０からなる群から選択される。或る実施形態において、近赤外基は、ＩＲＤｙｅ（商標）８００ＣＷ、ＩＲＤｙｅ（商標）８００、ＩＲＤｙｅ（商標）７００ＤＸ、ＩＲＤｙｅ（商標）７００、又はＤｙｎｏｍｉｃ　ＤＹ６７６である。

【００８２】

蛍光標識化（labeling）は、フルオロフォアの化学的に反応性の誘導体を用いて行われる。一般的な反応性基として、アミン反応性イソチオシアネート誘導体、例えば、ＦＩＴＣ及びＴＲＩＴＣ（フルオレセイン及びローダミンの誘導体）など、アミン反応性スクシンイミジルエステル、例えば、ＮＨＳ－フルオレセインなど、及びスルフヒドリル反応性マレイミド活性化フルオル（fluors）、例えば、フルオレセイン－５－マレイミドなど、を挙げることができ、それらの多くは商業的に入手可能である。これらの反応性色素のいずれかとＴＮＦα又は抗ＴＮＦα薬との反応は、フルオロフォアとＴＮＦα又は抗ＴＮＦα薬との間に形成される安定な共有結合を生じさせる。

【００８３】

或る実施形態においては、蛍光標識化反応の後、標識された標的分子から任意の非反応のフルオロフォアを除去する必要がしばしばある。これは多くの場合、フルオロフォアと標識されたタンパク質との間のサイズ差を利用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって達成される。

【００８４】

反応性蛍光色素は多くの供給源から入手することができる。標的分子内の種々の官能基への結合に対して異なる反応性基を用いてそれらを得ることができる。それらは、標識化反応を実施するための全ての構成要素を含む標識化キットにより利用することもできる。１つの好ましい側面において、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製のＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７　Ｃ２マレイミド（カタログ番号Ａ－２０３４７）を用いる。

【００８５】

抗ＴＮＦα抗体のＴＮＦαへの又は抗薬剤抗体（ＡＤＡ）の抗ＴＮＦα抗体への特異的な免疫学的結合は直接的に又は間接的に検出することができる。直接的な標識として、抗体に結合された蛍光又は発光タグ、金属、色素、放射性核種などを挙げることができる。或る場合に、試料中の抗ＴＮＦα抗体又はＡＤＡのそれぞれの濃度レベルを決定するのに、ヨウ素１２５（^{125}Ｉ）で標識されたＴＮＦα又は抗ＴＮＦα抗体を用いることができる。他の場合に、試料中の抗ＴＮＦα抗体又はＡＤＡのそれぞれに対して特異的な化学発光ＴＮＦα又は抗ＴＮＦα抗体を用いた化学発光アッセイが抗ＴＮＦα抗体又はＡＤＡ濃度レベルの高感度での非放射性検出に適している。特定の場合に、蛍光色素で標識されたＴＮＦα又は抗ＴＮＦα抗体も、試料中の抗ＴＮＦα抗体又はＡＤＡのそれぞれの濃度レベルを決定するのに適している。蛍光色素の例として、限定的でなく、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）色素、ＤＡＰＩ、フルオレセイン、ヘキスト（Hoechst）３３２５８、Ｒ－フィコシアニン、Ｂ－フィコエリトリン、Ｒ－フィコエリトリン、ローダミン、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ、及びリサミン（lissamine）を挙げることができる。蛍光色素に結合される二次抗体は商業的に入手することができ、例えば、ヤギＦ（ａｂ’）$_2$抗ヒトＩｇＧ－ＦＩＴＣは、Ｔａｇｏ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌｓ社（カリフォルニア州バーリンゲーム）から入手することができる。

【００８６】

間接的な標識として、当該技術分野で周知の種々の酵素、例えば、西洋ワサビペルオキ

シダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、β－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼなどを挙げることができる。西洋ワサビペルオキシダーゼ検出系は、例えば、４５０ｎｍにおいて検出可能な可溶性生成物を過酸化水素の存在下に生ずる色素生産性基質テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）と共に用いることができる。アルカリホスファターゼ検出系は、例えば、４０５ｎｍにおいて容易に検出可能な可溶性生成物を生ずる、色素生産性基質ｐ－ニトロフェニルホスフェートと共に用いることができる。同様に、β－ガラクトシダーゼ検出系は、４１０ｎｍにおいて検出可能な可溶性生成物を生ずる、色素生産性基質ｏ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＯＮＰＧ）と共に用いることができる。ウレアーゼ検出系は、基質、例えば、尿素－ブロモクレゾールパープル（Ｓｉｇｍａ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ社；ミズーリ州セントルイス）と共に用いることができる。酵素に結合される有用な二次抗体は多くの商業的供給源から入手することができ、例えば、ヤギＦ（ａｂ’）$_2$抗ヒトＩｇＧ－アルカリホスファターゼは、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社（ペンシルバニア州ウェストグローブ）から購入することができる。

【００８７】

直接的又は間接的な標識からのシグナルは、例えば、色素生産性基質由来の色を検出する分光光度計を用いて；放射線を検出する放射線測定器、例えば、^{125}Ｉの検出用ガンマカウンターなど、を用いて；又は所定の波長の光の存在下に蛍光を検出する蛍光光度計を用いて、分析することができる。酵素結合抗体の検出には、製造業者の使用説明書に従い、分光光度計、例えば、ＥＭＡＸ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社；カリフォルニア州メンロパーク）など、を用いて、抗ＴＮＦα抗体又はＡＤＡレベルの量の定量分析を行なうことができる。所望により、本発明のアッセイは自動化し又はロボット制御により実施することができ、そして多数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。

【００８８】

或る実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィーを用いる。ＳＥＣの根本的な原理は、異なるサイズの粒子は異なる速度で固定相を通って溶出する（濾過する）ことである。これは、溶液の粒子のサイズに基づいた分離をもたらす。全ての粒子が同時に又はほぼ同時にロードされるという条件で、同じサイズの粒子は一緒に溶出する。それぞれのサイズ排除カラムは、分離することができる分子量の範囲を有している。排除限界はこの範囲の上端の分子量を規定しそして分子が大きすぎて固定相にトラップすることができないところが排除限界である。透過限界は分離範囲の下端の分子量を規定しそして充分に小さなサイズの分子が完全に固定相の細孔中に浸透することができるところが透過限界であり、この分子質量未満の分子は全てとても小さいためシングルバンドとして溶出する。

【００８９】

或る側面において、溶出液を一定の体積、又は画分に集める。粒子がサイズにおいて類似していればいるほど、それらは同じ画分に存在し別々には検出されない可能性が高くなる。好ましくは、集めた画分を分光技術によって検査して溶出された粒子の濃度を決定する。典型的には、本発明に有用な分光検出技術として、限定的でなく、蛍光定量法、屈折率（ＲＩ）、及び紫外線（ＵＶ）を挙げることができる。或る場合に、溶出体積は分子流体力学的体積の対数に対してほぼ直線的に減少する（すなわち、より重い（heaver）部分が最初に抜け出る）。

【００９０】

或る側面において、これらの方法は、抗ＴＮＦα薬、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、キメラ抗ＴＮＦα mAb、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＴＮＦＲ－Ｉｇ Ｆｃ融合タンパク質、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ヒト抗ＴＮＦα mAb、及びＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、ペグ化Ｆａｂ断片を含む抗体など、の量を検出するのに有用である。

【００９１】

或る場合に、抗ＴＮＦα薬（例えば、抗ＴＮＦα抗体）を検出した後に、検量線（stan

dard curve）を用いて抗ＴＮＦα薬を測定する。
【００９２】
　別の実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬を試料と接触させて自己抗体との標識された複合体を形成する工程と；
（ｂ）前記標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して標識された複合体を分離する工程と；及び
（ｃ）標識された複合体の存在又はレベルを検出し（detecting the presence or level labeled complex）、それによって自己抗体を検出する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００９３】
　或る場合に、自己抗体として、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を挙げることができる。
【００９４】
　さらに別の実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬及び標識されたＴＮＦαを該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と、標識されたＴＮＦαと、そして自己抗体との間の第一の標識された複合体、及び標識された抗ＴＮＦα薬と自己抗体との間の第二の標識された複合体を形成し、ここで標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとは異なる標識を含んでいる、工程と；
（ｂ）前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーに付して第一の標識された複合体及び第二の標識された複合体を分離する工程と；及び
（ｃ）前記第一の標識された複合体及び前記第二の標識された複合体を検出し、それによって第一の標識された複合体及び第二の標識された複合体の双方が存在している場合には非中和型の自己抗体を検出し、そして第二の標識された複合体だけが存在している場合には中和型の自己抗体を検出する工程と、
を含む、方法を提供する。
【００９５】
　或る場合に、自己抗体として、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を挙げることができる。
【００９６】
　関連した実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを検出する方法であって、以下の工程：
（ａ）標識された抗ＴＮＦα薬を該抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体を有する又は有すると疑われる試料と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と自己抗体との間の第一の標識された複合体を形成する工程と；
（ｂ）前記第一の標識された複合体を第一のサイズ排除クロマトグラフィーに付して第一の標識された複合体を分離する工程と；
（ｃ）前記第一の標識された複合体を検出し、それによって自己抗体の存在又はレベルを検出する工程と；
（ｄ）標識されたＴＮＦαを前記第一の標識された複合体と接触させて、標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとの間の第二の標識された複合体を形成し、ここで標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとは異なる標識を含んでいる、工程と；
（ｅ）前記第二の標識された複合体を第二のサイズ排除クロマトグラフィーに付して、第二の標識された複合体を分離する工程と；及び
（ｆ）第二の標識された複合体を検出し、それによって中和型の自己抗体の存在又はレベルを検出する工程と、

を含む、方法を提供する。
【００９７】
　或る場合に、自己抗体として、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）を挙げることができる。
【００９８】
　他の実施形態において、本明細書中に記載したアッセイ方法を用いて、ＴＮＦα阻害剤に対する応答性、とりわけ、自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、クローン病など）を有する被験者における抗ＴＮＦα抗体に対する反応性を予測することができる。この方法において、抗ＴＮＦα抗体の正しい用量又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて被験者をアッセイすることによって、その個体がその治療に応答するか否かを予測することができる。
【００９９】
　別の実施形態において、本発明は、自己免疫疾患を有する被験者における自己免疫疾患を監視する方法であって、経時的に、抗ＴＮＦα抗体の正しい用量又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて被験者をアッセイすることを含む。この方法により、その個体が所与の時間期間にわたってその療法に応答するか否かを予測することができる。
【０１００】
　別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者に対する抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）被験者由来の第一の試料中の抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第一の試料を或る量の標識されたＴＮＦαと接触させて標識されたＴＮＦαを抗ＴＮＦα薬と共に含む第一の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第一の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程と、
を含む工程と；
（ｂ）被験者由来の第二の試料中の前記抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程であって、以下の工程：
（ｉ）前記第二の試料を或る量の標識された抗ＴＮＦα薬と接触させて標識された抗ＴＮＦα薬を自己抗体と共に含む第二の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第二の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって自己抗体のレベルを測定する工程と、
を含む工程と；及び
（ｃ）工程（ａ）において測定された抗ＴＮＦα薬のレベルから工程（ｂ）において測定された自己抗体のレベルを減算し、それによって前記抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と、
を含む、方法を提供する。
【０１０１】
　関連した実施形態において、本発明はさらに、工程（ａ）（ｉｉ）における検出が以下の工程：
（１）サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の第一のプロットから標識されたＴＮＦαのピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（２）第一のプロットから第一の複合体のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（３）工程（２）から結果として得られた積分を工程（１）から結果として得られた積分によって除することによって比を決定する工程と；及び
（４）標識されたＴＮＦαの前記量に工程（３）の比を乗ずる工程と、
を含む方法を提供する。
【０１０２】
　関連した実施形態において、本発明はさらに、工程（ｂ）（ｉｉ）における検出が、以下の工程：

（１）サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の第二プロットから標識された抗ＴＮＦα薬のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（２）第二のプロットから第二の複合体のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（３）工程（２）から結果として得られた積分を工程（１）から結果として得られた積分によって除することによって比を決定する工程と；及び
（４）標識された抗ＴＮＦα薬の前記量に工程（３）の比を乗ずる工程と、
を含む方法を提供する。
【０１０３】
関連した実施形態において、本発明はさらに、第一の試料及び第二の試料の双方が血清試料であることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬を用いた治療の間に被験者から前記第一の試料及び前記第二の試料の双方を得ることを提供する。なお別の関連した実施形態において、本発明はさらに、工程（ａ）（ｉｉ）及び／又は工程（ｂ）（ｉｉ）における検出が蛍光標識検出を含むことを提供する。
【０１０４】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における抗ＴＮＦαの治療量を最適化する方法であって、以下の工程：
（ａ）本発明の方法に従って抗ＴＮＦα薬の有効量を決定する工程と；
（ｂ）抗ＴＮＦα薬の前記有効量を抗ＴＮＦα薬の前記レベルと比較する工程と；及び
（ｃ）工程（ｃ）の比較に基づいて被験者に対する抗ＴＮＦα薬の今後の用量を決定し、それによって抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程と、
を含む、方法を提供する。
【０１０５】
関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬の有効量が抗ＴＮＦα薬のレベルより低い場合に抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させることを提供する。関連した実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬の有効量が抗ＴＮＦα薬のレベルにほぼ等しくなるように抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させることを提供する。
【０１０６】
或る他の実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーであることを提供する。
【０１０７】
或る実施形態において、抗ＴＮＦα薬はインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である。或る他の実施形態において、抗ＴＮＦα薬はアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である。他の実施形態において、抗ＴＮＦα薬はエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である。或る他の実施形態において、抗ＴＮＦα薬はＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である。他の実施形態において、標識されたＴＮＦαはフルオロフォアで標識されたＴＮＦαである。或る他の実施形態において、測定された抗ＴＮＦα薬を定量化する。或る実施形態において、測定されたＴＮＦαを定量化する。他の実施形態において、標識された複合体が最初に溶出され、その後にフリーの標識されたＴＮＦαが溶出される。或る他の実施形態において、標識された複合体が最初に溶出され、その後にフリーの標識された抗ＴＮＦα抗体が溶出される。或る実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィーはサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）である。或る他の実施形態において、自己抗体はヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、又はそれらの組み合わせから選択されるメンバーである。或る実施形態において、測定された自己抗体を定量化する。
【０１０８】
別の実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者において治療を最適化し及び／又は抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する方法であって、以下

の工程：
（ａ）被験者由来の第一の試料中の抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程と；
（ｂ）被験者由来の第二の試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベルを測定する工程と；及び
（ｃ）前記抗ＴＮＦα薬及び自己抗体のレベルに基づいて被験者に対する今後の治療過程を決定し、それによって治療を最適化し及び／又は抗ＴＮＦα薬に対する毒性を低減する工程と、
を含む、方法を提供する。
【０１０９】
　関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが高レベルでありかつ自己抗体のレベルが低レベルである場合に、抗ＴＮＦα薬と一緒に免疫抑制剤を同時投与することを含む。別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが中レベルでありかつ自己抗体のレベルが低レベルである場合に、抗ＴＮＦα薬のレベルを増加させかつ免疫抑制薬を同時投与することを含む。別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが中レベルでありかつ自己抗体のレベルが中レベルである場合に、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む。なお別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが低レベルでありかつ前記自己抗体のレベルが高レベルである場合に、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む。別の関連した実施形態において、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））の代わりにアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））を投与する。
【０１１０】
　或る実施形態において、語句「高レベルの抗ＴＮＦα薬」は、約１０～約１００ｎｇ／１０μＬ、約１０～約７０ｎｇ／１０μＬ、又は約１０～約５０ｎｇ／１０μＬの薬剤レベルを含む。他の実施形態において、語句「高レベルの抗ＴＮＦα薬」は約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００ｎｇ／１０μＬより多い薬剤レベルを含む。
【０１１１】
　或る実施形態において、語句「中レベルの抗ＴＮＦα薬」は、約５．０～約５０ｎｇ／１０μＬ、約５．０～約３０ｎｇ／１０μＬ、約５．０～約２０ｎｇ／１０μＬ、又は約５．０～約１０ｎｇ／１０μＬの薬剤レベルを含む。他の実施形態において、語句「中レベルの抗ＴＮＦα薬」は、約１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１ｎｇ／１０μＬの薬剤レベルを含む。
【０１１２】
　或る実施形態において、語句「低レベルの抗ＴＮＦα薬」は、約０～約１０ｎｇ／１０μＬ、約０～約８ｎｇ／１０μＬ、又は約０～約５ｎｇ／１０μＬの薬剤レベルを含む。他の実施形態において、語句「低レベルの抗ＴＮＦα薬」は、約１０、９．０、８．０、７．０、６．０、５．０、４．０、３．０、２．０、１．０、又は０．５ｎｇ／１０μＬよりほぼ少ない薬剤レベルを含む。
【０１１３】
　頭字語「ＡＤＡ」は、語句「抗薬剤抗体」を含む。
【０１１４】
　或る実施形態において、語句「高レベルの抗薬剤抗体」は、約３．０～約１００ｎｇ／１０μＬ、約３．０～約５０ｎｇ／１０μＬ、約１０～約１００ｎｇ／１０μＬ、約１０～約５０ｎｇ／１０μＬ、又は約２０～約５０ｎｇ／１０μＬの抗薬剤抗体レベルを含む。或る他の実施形態において、語句「高レベルの抗薬剤抗体」は、約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００ｎｇ／１０μＬよりほぼ多い抗薬剤抗体レベルを含む。
【０１１５】
　或る実施形態において、語句「中レベルの抗薬剤抗体」は、約０．５～約２０ｎｇ／１０μＬ、約０．５～約１０ｎｇ／１０μＬ、約２．０～約２０ｎｇ／１０μＬ、約２．０

～約１０ｎｇ／１０μＬ、約２．０～約５．０ｎｇ／１０μＬ、又は約２．０～約５．０ｎｇ／１０μＬの抗薬剤抗体レベルを含む。
【０１１６】
或る実施形態において、語句「低レベルの抗薬剤抗体」は、約０．０～約５．０ｎｇ／１０μＬ、約０．１～約５．０ｎｇ／１０μＬ、約０．０～約２．０ｎｇ／１０μＬ、約０．１～約２．０ｎｇ／１０μＬ、又は約０．５～約２．０ｎｇ／１０μＬの抗薬剤抗体レベルを含む。他の実施形態において、語句「低レベルの抗薬剤抗体」は、約５．０、４．０、３．０、２．０、１．０、又は０．５ｎｇ／１０μＬよりほぼ少ない抗薬剤抗体レベルを含む。
【０１１７】
或る実施形態において、本発明の方法はさらに、以下の工程：
（ｉ）第一の試料を或る量の標識されたＴＮＦαと接触させて標識されたＴＮＦαを抗ＴＮＦα薬と共に含む第一の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第一の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって抗ＴＮＦα薬のレベルを測定する工程と、
を含むアッセイを用いて抗ＴＮＦα薬を測定することを提供する。
【０１１８】
或る実施形態において、本発明の方法はさらに、以下の工程：
（ｉ）第二の試料を或る量の標識された抗ＴＮＦα薬と接触させて標識された抗ＴＮＦα薬を自己抗体と共に含む第二の複合体を形成する工程と；及び
（ｉｉ）前記第二の複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって検出し、それによって自己抗体のレベルを測定する工程と、
を含むアッセイを用いて自己抗体を測定することを提供する。
【０１１９】
関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、抗ＴＮＦα薬がＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーであることを提供する。関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））であることを提供する。或る他の実施形態において、抗ＴＮＦα薬はアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である。或る他の実施形態において、抗ＴＮＦα薬はエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）であることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、測定された抗ＴＮＦα薬を定量化することを提供する。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、第一の試料及び第二の試料の双方が血清であることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、抗ＴＮＦα薬を用いた治療の間に被験者から第一の試料及び第二の試料の双方を得ることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、自己抗体がヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、又はそれらの組み合わせから選択されるメンバーであることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、測定された自己抗体を定量化することを提供する。
【０１２０】
或る実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を有する又は有すると疑われる試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、以下の工程：
（ａ）或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて標識されたＴＮＦαと抗ＴＮＦα薬との複合体を形成する工程と；
（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識されたＴＮＦα及び前記標識された内部標準を検出する工程と；

（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識されたＴＮＦαのピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；
（ｅ）標識されたＴＮＦαの前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；
（ｆ）工程（ｃ）から結果として得られた積分を工程（ｄ）から結果として得られた積分で除することによって第二の比を決定する工程と；及び
（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記抗ＴＮＦα薬の存在又はレベルを決定する工程と、
を含む、方法を提供する。
【０１２１】
関連した実施形態において、本発明はさらに、工程（ｅ）において決定された第一の比が約８０：１～約１００：１であることを提供する。別の関連した実施形態において、本発明はさらに、工程（ｅ）において決定された第一の比が約１００：１であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、標識された内部標準がＢｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８であることを提供する。或る実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は、分析される試料１００μＬ当たり約１～約２５ｎｇである。或る他の実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は、分析される試料１００μＬ当たり約５～約２５ｎｇ、分析される試料１００μＬ当たり約５～約２０ｎｇ、分析される試料１００μＬ当たり約１～約２０ｎｇ、分析される試料１００μＬ当たり約１～約１０ｎｇ、又は分析される試料１００μＬ当たり約１～約５ｎｇである。さらなる実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は、分析される試料１００μＬ当たり約１、５、１０、１５、２０、又は２５ｎｇである。
【０１２２】
或る実施形態において、本発明は、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者における抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する方法であって、以下の工程：本発明の方法に従って前記第一の比と前記第二の比との比較に基づいて被験者に対する抗ＴＮＦαの今後の用量を決定し、それによって抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程、を含む方法を提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、前記方法が、以下の工程：前記第一の比が約１００：１でありかつ前記第二の比が約９５：１未満である場合に抗ＴＮＦα薬の今後の用量を増加させ、それによって抗ＴＮＦα薬の治療量を最適化する工程、を含むことを提供する。別の関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーであることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮＦα薬がＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、標識されたＴＮＦαがフルオロフォアで標識されたＴＮＦαであることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、検出された抗ＴＮＦα薬を定量化することを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、標識された複合体が最初に溶出され、その後にフリーの標識されたＴＮＦαが溶出されることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、試料が血清であることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、抗ＴＮ

Ｆα薬を用いた治療を受けている被験者から試料を得ることを提供する。関連した実施形態において、本発明はさらに、サイズ排除クロマトグラフィーがサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）であることを提供する。

【０１２３】

或る実施形態において、本発明は、自己抗体を有する又は有すると疑われる試料中の抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを内部標準を参照して決定する方法であって、以下の工程：

（ａ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を前記試料と接触させて前記標識された抗ＴＮＦα薬と前記自己抗体との複合体を形成する工程と；

（ｂ）サイズ排除クロマトグラフィーによって前記標識された抗ＴＮＦα及び前記標識された内部標準を検出する工程と；

（ｃ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから前記標識された抗ＴＮＦα薬のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；

（ｄ）前記サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出時間の関数としてのシグナル強度の前記プロットから前記標識された内部標準のピークに対する曲線下面積を積分する工程と；

（ｅ）標識された抗ＴＮＦα薬の前記量を標識された内部標準の前記量で除することによって第一の比を決定する工程と；及び

（ｆ）工程（ｃ）及び工程（ｄ）から結果として得られた積分を除することによって第二の比を決定する工程と；及び

（ｇ）工程（ｅ）において決定された第一の比を工程（ｆ）において決定された第二の比と比較し、それによって内部標準を参照して前記自己抗体の存在又はレベルを決定する工程と、

を含む、方法を提供する。

【０１２４】

関連した実施形態において、工程（ｅ）において決定された第一の比は約８０：１～約１００：１である。別の関連した実施形態において、工程（ｅ）において決定された第一の比は約１００：１である。関連した実施形態において、標識された内部標準はＢｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８である。或る実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は分析される試料１００μＬ当たり約５０～約２００ｐｇである。或る他の実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は、分析される試料１００μＬ当たり約１００～約２００ｐｇ、分析される試料１００μＬ当たり約１５０～約２００ｐｇ、分析される試料１００μＬ当たり約５０～約１５０ｐｇ、又は分析される試料１００μＬ当たり約５０～約１００ｐｇである。さらなる実施形態において、標識された内部標準（例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８）の量は、分析される試料１００μＬ当たり約５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ｐｇである。

【０１２５】

関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬はインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））である。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬はアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））である。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬はエタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（商品名））である。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬はＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）である。関連した実施形態において、検出された自己抗体を定量化する。関連した実施形態において、標識された複合体が最初に溶出され、その後にフリーの標識された抗ＴＮＦα抗体が溶出される。関連した実施形態において、試料は血清である。関連した実施形態に

おいて、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者から試料を得る。関連した実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィーはサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）である。関連した実施形態において、自己抗体はヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。関連した実施形態において、検出された自己抗体を定量化する。

【０１２６】

関連した実施形態において、本発明の方法はさらに、今後の治療過程を決定することを提供する。今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが高レベルでありかつ自己抗体のレベルが低レベルである場合に、抗ＴＮＦα薬と一緒に免疫抑制剤を同時投与することを含む。別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが中レベルでありかつ自己抗体のレベルが低レベルである場合に、抗ＴＮＦα薬のレベルを増加させかつ免疫抑制薬を同時投与することを含む。別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが中レベルでありかつ自己抗体のレベルが中レベルである場合に、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む。なお別の関連した実施形態において、今後の治療過程は、抗ＴＮＦα薬のレベルが低レベルでありかつ自己抗体のレベルが高レベルである場合に、異なる抗ＴＮＦα薬を投与することを含む。別の関連した実施形態において、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））の代わりにアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））を投与する。

【０１２７】

或る実施形態において、本発明は、試料中の抗ＴＮＦα薬の存在又はレベル及び抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体の存在又はレベルを測定するキットであって、以下：

（ａ）或る量の標識されたＴＮＦαを含む第一の測定基体と；

（ｂ）或る量の標識された抗ＴＮＦα薬を含む第二の測定基体と；

（ｃ）場合により、或る量の標識されたＴＮＦα及び或る量の標識された内部標準を含む第三の測定基体と；

（ｄ）場合により、或る量の標識された抗ＴＮＦα薬及び或る量の標識された内部標準を含む第四の測定基体と；

（ｅ）場合により、被験者から試料を抽出する手段と；及び

（ｆ）場合により、前記キットを使用するための取扱説明書と、

を含む、キットを提供する。

【０１２８】

関連した実施形態において、前記基体は、本発明の化学薬品（chemicals）と共に堆積させる（deposit）ことができる任意の材料を含み、そして前記基体として、限定的でなく、ニトロセルロース、シリカゲル、薄層クロマトグラフィー基体、木製スティック、セルロース、綿、ポリエチレン、それらの組み合わせなど、を挙げることができる。別の関連した実施形態において、配列されたアレイ、マトリックス、又はマトリックスアレイにおいて前記材料上に本発明の化学薬品を堆積させることができる。

【０１２９】

関連した実施形態において、前記キットはさらに、標識されたＴＮＦα、標識された抗ＴＮＦα薬、及び／又は標識された内部標準を検出する手段を含む。関連した実施形態において、前記キットはさらに、限定的でなく、蛍光標識検出、ＵＶ照射検出、又はヨウ素照射を含む検出手段を含む。関連した実施形態において、前記キットはさらに、サイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）装置を含む。関連した実施形態において、ニトロセルロース、シリカゲル、及びサイズ排除クロマトグラフ媒体から第一、第二、第三、及び第四の測定基体を選択する。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。関連した実施形態において、標識されたＴＮＦαはフルオロフォアで標識されたＴＮＦ

αである。関連した実施形態において、試料は血清である。関連した実施形態において、抗ＴＮＦα薬を用いた治療を受けている被験者から試料を得る。関連した実施形態において、自己抗体は、ヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）、ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、ヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。

【０１３０】

ＩＶ．本発明に関連した種類（species）の生理学的範囲及びレベル

ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を用いて治療される患者のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）約１～１０ｍｇの範囲にある。或る実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）３～８ｍｇの範囲にある。或る他の実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）約５ｍｇである。

【０１３１】

ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）の典型的な用量は、１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約８０μｇの範囲にある。或る実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約５０μｇの範囲にある。或る他の実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約３０μｇである。或る実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約３０μｇである。或る他の実施形態において、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約５０μｇである。

【０１３２】

ＨＵＭＩＲＡ（商品名）を用いて治療される患者のＨＵＭＩＲＡ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＨＵＭＩＲＡ（商品名）約０．１～１０ｍｇの範囲にある。或る実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＨＵＭＩＲＡ（商品名）０．１～８ｍｇの範囲にある。或る他の実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＨＵＭＩＲＡ（商品名）約１ｍｇの範囲にある。或る実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の治療有効レベルは、患者体重１ｋｇ当たりＨＵＭＩＲＡ（商品名）約０．８ｍｇである。

【０１３３】

ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の典型的な用量は、１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約１５０μｇの範囲にある。或る実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約１００μｇの範囲にある。或る他の実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約０．０５μｇ～約５０μｇである。或る実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約３０μｇである。或る実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約３２μｇである。或る他の実施形態において、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の用量は１ｍＬ当たり約５０μｇである。

【０１３４】

Ｖ．典型的な疾病及びその治療のための治療抗体

或る実施形態において、本発明は治療モノクローナル抗体を用いることができる。表１は、承認されている又は現在開発中である治療モノクローナル抗体の典型的なリストを提供する。臨床開発中のモノクローナル抗体治療薬及び承認製品の広範なリストは、「418 Biotechnology Medicines in Testing Promise to Bolster the Arsenal Against Disease」と題された2006 PhRMA Reportに開示されている。

【０１３５】

とりわけ好ましい治療抗体として、限定的でなく、抗ＴＮＦαモノクローナル抗体、例えば、（１）Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商品名）（インフリキシマブ）、マウス－ヒトＩｇＧＩ－カッパ抗ＴＮＦαモノクローナル抗体、（２）Ｅｎｂｒｅｌ（商品名）（エタネルセプト）、ヒトＴＮＦ受容体２とヒトＩｇＧＩとの融合タンパク質、及び（３）Ｈｕｍｉｒａ（商品名）（アダリムマブ）、完全ヒトＩｇＧ１－カッパ抗ＴＮＦαモノクローナル抗体

など、を挙げることができる。２つの他の抗ＴＮＦα抗体構築物は、同じ疾病の一部を有する患者において重要なフェーズＩＩＩ試験で有望性を示した：（４）Ｃｉｍｚｉａ（商品名）ＣＤＰ８７０（セルトリズマブ ペゴル）、ヒト化抗ＴＮＦαモノクローナル抗体のペグ化Ｆａｂ断片、及び（５）ＣＮＴＯ１４８（ゴリムルナブ（golimlunab））、完全ヒトＩｇＧＩ－カッパ抗ＴＮＦαモノクローナル抗体。

【０１３６】

好ましい種類の治療抗体は、多くの自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチ、若年性特発性関節炎、強直性脊椎炎（ベヒテレフ病）、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）、重度（severe）乾癬、慢性ブドウ膜炎、重度サルコイドーシス、及びウェゲナー肉芽腫症など、の治療に用いられる抗ＴＮＦα単鎖モノクローナル抗体である。

10

【０１３７】

本発明は、抗ＴＮＦαのバイオアベイラビリティ／濃度を決定するのに有用であることに加えて、例えば、治療又は診断の目的などで、体内で用いられた任意の治療抗体のバイオアベイラビリティ／濃度を決定することに用いるのにも適している。以下の表１はインビボで用いられる種々の治療モノクローナル抗体と相関する医療的適応の一覧も提供する。

【０１３８】

さらなる実施形態において、本発明の方法は、治療抗体に対する自己抗体の存在又は濃度レベルの決定に用いるのに適している。

【０１３９】

20

従って、本発明は、治療（又は診断）が被験者に治療抗体を投与することを含む治療を最適化する方法に用いることができる。前記方法は、本明細書中で言及した疾病又は疾患１種又は２種以上の治療（又は診断）を最適化するためのものであることができ、該疾病又は疾患は下記の１種又は２種以上を含む：

【０１４０】

感染症、例えば、呼吸器系合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ＨＩＶ、炭疽、カンジダ症、ブドウ球菌感染、Ｃ型肝炎など。

【０１４１】

自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチ、クローン病、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症（Multiple scleorisis）、ＳＬＥ、強直性脊椎炎、狼瘡、乾癬性関節炎、エリテマトーデス（erythematosus）など。

30

【０１４２】

炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ（ＲＡ）、若年性特発性関節炎（juvenile idiopatmc arthritis）、強直性脊椎炎（ベヒテレフ病）、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）、重度乾癬、慢性ブドウ膜炎、サルコイドーシス、ウェゲナー肉芽腫症、及び中心的特徴として炎症を伴う他の疾患など。

【０１４３】

血液疾患、例えば、敗血症、敗血性ショック、発作性夜間血色素尿症、及び溶血性尿毒症症候群など。

【０１４４】

40

癌、例えば、結腸直腸癌、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病、未分化大細胞リンパ腫、頭頸部の扁平上皮細胞癌、ＨＥＲ２過剰発現転移性乳癌の治療、急性骨髄性白血病、前立腺癌（例えば、腺癌）、小細胞肺癌、甲状腺癌、悪性黒色腫、固形腫瘍、乳癌、早期ＨＥＲ２陽性乳癌、第一選択の非扁平上皮ＮＳＣＬＣ癌、ＡＭＬ、ヘアリー細胞白血病、神経芽腫、腎癌、脳腫瘍、骨髄腫、多発性骨髄腫、骨転移、ＳＣＬＣ、頭／頸部癌、第一選択の膵臓癌、ＳＣＬＣ、ＮＳＣＬＣ、頭部及び頸部の癌、血液系及び固形腫瘍、進行性固形腫瘍、消化管癌、膵癌、皮膚Ｔ細胞性リンパ腫、非皮膚Ｔ細胞性リンパ腫、ＣＬＬ、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌、メソテリン発現腫瘍、膠芽細胞腫、転移性膵臓、血液悪性腫瘍、皮膚未分化大細胞ＭＡｂリンパ腫、ＡＭＬ、骨髄異形成症候群など。

【０１４５】

50

循環器疾病、例えば、アテローム性動脈硬化症急性心筋梗塞、心肺バイパス、アンギナなど。
【０１４６】
代謝疾患、例えば、糖尿病、例えば、Ｉ型糖尿病など。
【０１４７】
消化器疾患、例えば、クローン病、クロストリジウム・ディフィシレ（C. difficile）病、潰瘍性大腸炎など。
【０１４８】
眼疾患、例えば、ブドウ膜炎など。
【０１４９】
遺伝的疾患、例えば、発作性夜間血色素尿症（ＰＮＨ）など。
【０１５０】
神経学的疾患、例えば、変形性関節症の痛み及びアルツハイマー病など。
【０１５１】
呼吸器疾患、例えば、呼吸器疾病、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ、鼻ポリープ症、小児喘息など。
【０１５２】
皮膚疾患、例えば、慢性の中等度から重度のプラーク乾癬を含む、乾癬など。
【０１５３】
移植片拒絶、例えば、急性腎臓移植拒絶反応、心臓及び肝臓移植拒絶反応の逆転（reversal）、腎臓移植拒絶反応の防止、急性腎臓移植拒絶反応の予防、腎臓移植拒絶反応など。
【０１５４】
他の疾患、例えば、虫垂炎の診断、腎炎、閉経後骨粗しょう症（骨疾患）、過好酸球増加症候群、好酸球性食道炎及びピーナッツアレルギーなど。
【０１５５】
１つの実施形態において、疾病は、上記群の特定の疾病及び疾患の１つ又は２つ以上から選択される。

【表１】

治療及び診断モノクローナル抗体		
製品名	治験依頼者	適応症
感染症		
Synagis（商標） パリビズマブ	MedImmune 社	呼吸器系合胞体ウイルス（RSV）の予防
抗 HIV-1 MAb	Polymun Scientific 社 オーストリア、ヴィエナ	HIV 感染治療
CCR5 MAb	Hunan Genome Sciences 社 メリーランド州ロックビル	HIV 感染
Cytolin（商標） 抗 CD8 MAb	CytoDyn 社 ニューメキシコ州サンタフェ	HIV 感染
NM01	SRD Pharmaceuticals 社 カリフォルニア州ロサンゼルス	HIV 感染
PRO 140	Progenics Pharmaceuticals 社 ニューヨーク州タリータウン	HIV 感染
TNX	355 Tanox MAb HIV 感染フェーズ（Please）II	355 Tanox MAb HIV 感染フェーズ II
ABthrax（商品名） ラキシバクマブ（raxibacumab）	Human Genome Sciences 社	炭疽
Anthim（商品名） （ETI-204） （オーファンドラッグ）	Elusys Therapeutics 社	炭疽
抗 hsp90 MAb	NeuTec Pharma 社	カンジダ症
抗 staph MAb	MedImmune 社	ブドウ球菌感染の予防
Aurexis テフィバズマブ	Inhibitex 社	黄色ブドウ球菌血症の予防及び治療
バビツキシマブ	Peregrine Pharmaceuticals 社	Ｃ型肝炎治療
MDX-1303	Medarex 社 PharmAthene 社	炭疽
Numax（商品名） モタビズマブ	MedImmune 社	RSV
Tarvacin（商品名）	Peregrine 社	Ｃ型肝炎
バビツキシマブ	Pharmaceuticals 社	
XTL 6865	XTL Biopharmaceuticals 社	Ｃ型肝炎
自己免疫疾患		
Humira（商標） アダリムマブ	Abbott Laboratories 社	慢性関節リウマチ
Remicade（商品名） インフリキシマブ	Centocor 社	クローン病、慢性関節リウマチ
Rituxan（商標） リチキシマブ（ritiximab）	Genentech 社 Biogen Idec 社	Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、リツキサン治療後の患者における再発。 慢性関節リウマチ
Tysarbi（商標） ナタリズマブ	Biogen Idec 社	多発性硬化症（Multiple scleorisis）
ART 874	Abbott Laboratories 社	多発性硬化症
Actemra	Roche 社	慢性関節リウマチ
AME 527	Applied Molecular 社	慢性関節リウマチ
AMG 108	Amgen 社	慢性関節リウマチ
AMG 714	Amgen 社	慢性関節リウマチ
抗 CD16 MAb	MacroGenics 社	免疫性血小板減少症（thrombocytopenic）
CNTO 1275	Centocor 社 ペンシルバニア州ホーシャム（Horham）	多発性硬化症

10

20

30

40

ダクリズマブ （抗 CD25 MAb）	PDL BioPharma 社 カリフォルニア州フリーモント Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	多発性硬化症 （呼吸器も参照）
デノスマブ（denosumah） （AMG 162）	Amgen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	慢性関節リウマチ
ETI-201	Elusys Therapeutics 社 ニュージャージー州パインブルック	SLE
ゴリムマブ	Centocor 社 ペンシルバニア州ホーシャム	慢性関節リウマチ
HuMax-CD20 （オファツムマブ）	Genmab 社 ニュージャージー州プリンストン	慢性関節リウマチ
Humira（商標） アダリムマブ	Abbott Laboratories 社	強直性脊椎炎 若年性関節リウマチ
HuZAF（商品名） フォントリズマブ	PDL BioPharma 社 カリフォルニア州フリーモント Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	慢性関節リウマチ
IMMU-106 （hCD20）	Immunomedics 社 ニュージャージー州モリスプレーンズ	自己免疫疾患
LymphoStat-B（商品名） ベリムマブ	Human Genome Sciences 社 メリーランド州ロックビル	慢性関節リウマチ、SLE
MEDI-545 （MDX-1103）	Medarex 社 ニュージャージー州プリンストン MedImmune 社 メリーランド州ゲイザースバーグ	狼瘡
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	多発性硬化症
オクレリズマブ （二次抗 CD20） （R1594）	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ Roche 社 ニュージャージー州ナットリー	慢性関節リウマチ
OKT3－ガンマー１	Johnson & Johnson 社 Pharmaceutical Research & Development 社 ニュージャージー州ラリタン	乾癬性関節炎
Rituxan（商標）リツキシマブ	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ Biogen Idec 社	慢性関節リウマチ （DMARD 不充分応答者）、狼瘡、原発性進行型多発性硬化症、SLE （癌も参照）再発寛解型多発性硬
	マサチューセッツ州ケンブリッジ	化症
TRX 1 （抗 CD4）	TolerRx 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	皮膚狼瘡エリテマトーデス （cutaneous lupus erythetnatosus ）
	血液疾患	
ReoPro（商標）	Centocor 社	抗血小板 血餅の予防
アブシキシマブ	Eli Lilly 社	（PTCA）、アンギナ（PTCA）
ウルトキサズマブ	Teijin Pharma 社	溶血性尿毒症(hemolytic uremic)
アフェリモマブ	Abbot Laboratories 社	敗血症、敗血性ショック
エクリズマブ	Alexion Pharmaceuticals 社	発作性夜間血色素尿症
	癌	
Avastin（商品名） ベバシズマブ	Genentech 社	転移性結腸直腸癌

10

20

30

40

Bexxar（商標） トシツモマブ、 ヨウ素 I131 トシツモマブ	GlaxoSmithKline 社	非ホジキンリンパ腫
Campath（商標） アレムツズマブ	Berlex Laboratories 社 Genzyme 社	Ｂ細胞慢性リンパ性白血病
Erbitux（商品名） セツキシマブ	Bristol-Myers Squibb 社 Medarex 社	結腸直腸癌 頭頸部の扁平上皮細胞癌
Herceptin（商標） トラスツズマブ	Genentech 社	ＨＥＲ２過剰発現転移性乳癌の治療
Mylotarg（商品名） ゲムツズマブ オゾガミシン	Wyeth 社	急性骨髄性白血病
OncoScint（商標） CR/OV サツモマブ ペンデチド	CYTOGEN 社	結腸直腸癌の検出、ステージング及びフォローアップ
ProstaScint（商標） カプロマブ ペンテテート	CYTOGEN 社	前立腺癌の検出、ステージング及びフォローアップ
Rituxan（商標）	Genentech 社	B 細胞非ホジキンリンパ腫、再発
リチキシマブ	Biogen Idec 社	リツキサン治療後の患者において
Verluma（商標）ノレツモマブ（noletumomab）	DuPont Pharmaceuticals 社	小細胞肺癌の検出
Zevalin（商品名）イブリツモマブ チウキセタン	IDFC Pharmaceuticals 社	非ホジキンリンパ腫
1311 huA33	Life Science Pharmaceuticals 社 コネチカット州グリニッジ	結腸直腸癌
1D09C3	GPC Biotech 社 マサチューセッツ州ウォルサム	再発／難治性Ｂ細胞リンパ腫
AGS PSCA MAb	Agensys 社 カリフォルニア州サンタモニカ Merck 社 ニュージャージー州ホワイトハウスステーション	前立腺癌
AMG 102	Amgen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	癌
AMG 479	Amgen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	癌
AMG 623	Amgen 社 サウザンドオークス	Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（CLL）（自己免疫も参照）
AMG 655	Amgen 社 サウザンドオークス	癌
AMG 706	Amgen 社 サウザンドオークス	イマチニブ抵抗性 GIST、進行性甲状腺癌
AMG 706	Arngen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	イマチニブ抵抗性 GIST、進行性甲状腺癌
抗 CD23 MAb	Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	CLL
抗 CD80 MAb	Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	非ホジキンＢ
抗イディオタイプ 癌ワクチン	Viventia Biotech 社 オンタリオ州トロント	悪性黒色腫
抗リンフォトキシン ベータ受容体 MAb	Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	固形腫瘍
抗 PEM MAb	Somanta Pharmaceuticals 社 カリフォルニア州アーバイン	癌
抗 Tac(Fv)－ PE38 イムノトキシン	米国国立癌研究所 メリーランド州ベセスダ	白血病、リンパ種

10

20

30

40

Avastin（商標）ベバシズマブ	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	再発転移性結腸直腸癌 第一選択の転移性乳癌、第一選択の非扁平上皮 NSCLC 癌
AVE 9633 マイタンシンーロード（loaded）抗 CD33 MAb	sanofi aventis 社 ニュージャージー州ブリッジウォーター	AML
バビツキシマブ	Peregrine Pharmaceuticals 社 カリフォルニア州タスティン	固形腫瘍（感染症も参照）
CAT 3888	Cambridge Antibody Technology 社	ヘアリー細胞白血病
キメラ MAb	米国国立癌研究所	神経芽腫
CNTO 328	Centocor 社	腎癌
Cotara（商品名）	Peregrine Pharmaceuticals 社	脳腫瘍
ビバツズマブ	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals 社 コネチカット州リッジフィールド	癌
CP-751、871 CS 1008	Pfizer 社 Daiichi Sankyo Sankyo Sankyo Pharma Development 社 ニュージャージー州パーシッパニー	多発性骨髄腫癌
BrevaRex（商品名）	ViRexx 社	乳癌、複数
抗体ベースの免疫治療	アルバータ州エドモントン	骨髄腫
デノスマブ	Amgen 社	乳癌又は前立腺癌のホルモンアブレーション治療により誘発された骨量減少、骨転移のない生存延長（自己免疫、その他も参照） 乳癌における骨転移
エクロメキシマブ（ecromeximab）	Kyowa Hakko USA 社	悪性黒色腫
EMD 273063	EMD Lexigen 社	固形腫瘍 悪性黒色腫、神経芽腫、SCLC
Erbitux（商品名）	Bristol Myers Squibb 社	頭／頸部癌、第一選択の膵臓（palicreatic）癌、第一選択の NSCLC 癌、第二選択の NSCLC 癌、第一選択の結腸直腸癌、第二選択の結腸直腸癌
GMK	Progenies Pharmaceuticals 社	高リスク患者における原発性（primacy）黒色腫除去手術後の再発予防
Campath（商標）アレムツズマブ	米国国立癌研究所 メリーランド州ベセスダ Berlex Laboratories 社 ニュージャージー州モントビル	白血病、リンパ腫
Herceptin（商標）トラスツズマブ	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	初期ステージ HER2 陽性乳癌 第一選択の転移性 HER2 陽性乳癌 Taxotere （商標）との組み合わせ
HGS-ETR1	Human Genome Sciences 社 メリーランド州ロックビル	血液系腫瘍及び固形腫瘍
HGS ETR2（マパツムマブ）	Human Genome Sciences 社 メリーランド州ロックビル	血液系腫瘍及び固形腫瘍
HGS-TR2J	Human Genome Sciences 社 メリーランド州ロックビル	進行性固形腫瘍
HuC242-DM4	ImmunoGen 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	結腸直腸癌、消化管癌、NSCLC 癌、膵癌
HuMax-CD4（ザノリムマブ）	Genmab 社 ニュージャージー州プリンストン Serono 社 マサチューセッツ州ロックランド	皮膚Ｔ細胞性リンパ腫 非皮膚Ｔ細胞性リンパ腫
HuMax CD20（オファツムマブ）	Gemnab 社 ニュージャージー州プリンストン	CLL、非ホジキンリンパ腫 （自己免疫も参照）
HuMax-EGFr	Genmab 社 ニュージャージー州プリンストン	頭頸部癌

10

20

30

40

huN901-DM1	ImmunoGen社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	SCLC 多発性骨髄腫
イピリムマブ（MDX	Bristol-Myers Squibb社 Medarex社、プリンストン	黒色腫の単剤療法 白血病、リンパ腫、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌 黒色腫（MCX-010 +/- DTIC） 第二選択の転移性黒色腫 (MDX-010 ジソモチド(disomotide)／オーバーモチド(overmotide)MDX-1379)
M195－ビスマス	Actinium社	AML
213コンジュゲート	Pharmaceuticals社 ニュージャージー州フローラムパーク	
M200（ボロシキシマブ（volocixirnab)）	PDL BioPharma社 カリフォルニア州フリーモント Biogen Idec社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	進行性固形腫瘍
MAb HeFi-1	米国国立癌研究所 メリーランド州ベセスダ	リンパ腫、非ホジキンリンパ腫
MDX-060 （イラツムマブ）	Medarex社 ニュージャージー州プリンストン	ホジキン病、未分化大細胞リンパ腫
MDX-070	Medarex社 ニュージャージー州プリンストン	前立腺癌
MDX-214	Medarex社 ニュージャージー州プリンストン	ECFR発現性癌
MEDI-507 シプリズマブ MEDI-522	MedImmune社 メリーランド州ゲイザースバーグ MedImmune社 メリーランド州ゲイザースバーグ 米国国立癌研究所 メリーランド州ベセスダ MedImmune社 メリーランド州ゲイザースバーグ	T細胞性リンパ腫感染 黒色腫、前立腺癌 固形腫瘍
MORAb 003	Morphotek社 ペンシルバニア州エクストン	卵巣癌
MORAb 009	Morphotek社 ペンシルバニア州エクストン	メソテリン発現性腫瘍
ノイラジアブ（neuradiab）	Bradmer Pharmaceuticals社 ケンタッキー州ルイビル	膠芽細胞腫
ニモツズマブ （オーファンドラッグ） オクレリズマブ （二次抗CD20） （R1594）	YM Biosciences社 オンタリオ州ミシサーガ Genentech社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ Biogen Idec社 マサチューセッツ州ケンブリッジ Roche社 ニュージャージー州ナットリー	転移性膵癌、NSCLC血液悪性疾患（自己免疫も参照）
Omnitarg（商品名） ペルツズマブ	Genentech社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	卵巣癌
OvaRex（商標） オレゴボマブ	ViRexx MAb アルバータ州エドモントン	卵巣癌
PAM 4	Merck社 ニュージャージー州ホワイトハウスステーション	膵癌
パニツムマブ（rIluMAb EGFr）	Abgenix社	結腸直腸癌
Proleukin（商標） PSMA	Chiron社 カリフォルニア州エメリービル Progenics Pharmaceuticals社 ニューヨーク州タリータウン	非ホジキンリンパ腫 前立腺癌

10

20

30

40

R1550 RadioTheraCIM	Roche 社 ニュージャージー州ナットリー YM YM BioSciences 社 オンタリオ州ミシサーガ	転移性乳癌 神経膠腫
RAV 12	Raven Biotechnologies 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	癌
Renearex （商標） G250	Wilex Miulich 社 ドイツ	腎癌
Rituxan（商標） リツキシマブ	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	緩慢性非ホジキンリンパ腫導入療法（自己免疫も参照）再発性又は難治性 CLL
SGN30 （オーファンドラッグ）	Seattle Genetics 社 ワシントン州ボセル	皮膚未分化大細胞 MAb リンパ腫、全身性未分化大細胞リンパ腫、ホジキン病
SGN-33（リンツズマブ） SGN-40	Seattle Genetics 社 ワシントン州ボセル Seattle Genetics 社 ワシントン州ボセル	AML、骨髄異形成症候群 CLL 多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫
シブロツルツナブ (sibroturtunab)	Life Science Pharmaceuticals 社 コネチカット州グリニッジ	結腸直腸癌、頭頸部の癌、肺癌
Tarvacin（商品名） バビツキシマブ	Peregrine Pharmaceuticals 社 カリフォルニア州タスティン	固形腫瘍（感染も参照）
チシリムマブ	Pfizer 社 ニューヨーク州ニューヨーク	転移性黒色腫 前立腺癌　チシリムマブ
TNX-650 Zevalin（商品名） イブリツモマブ チウキセタン	Tanox 社 テキサス州ヒューストン 米国国立癌研究所 ベセスダ Biogen 社	ホジキン病 白血病、リンパ腫 非ホジキンリンパ腫
循環器疾患		
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	アテローム硬化症 （自己免疫も参照）
ペキセリズマブ	Alexion Pharmaceuticals 社 コネチカット州チェシャイアー Procter & Gamble Pharmaceuticals 社 オハイオ州メーソン	急性心筋梗塞、心肺バイパス
糖尿病及び関連症状		
抗 CD3 MAb	MacroGenics 社 メリーランド州ロックビル	１型糖尿病
OKT3－ガンマー１	Johnson & Johnson 社 Pharmaceutical Research & Development 社	１型糖尿病
TRX 4 （抗 CD3）	TolerRx 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	１型糖尿病
消化器疾患		
Remicade（商品名） インフリキシマブ	Centocor 社	クローン病
ABT 874	Abbott Laboratories 社 イリノイ州アボットパーク	クローン病 （自己免疫も参照）
CN'l'0 1275	Centocor 社 ペンシルバニア州ホーシャム	クローン病（Crolin’s disease）フェーズ II （自己免疫（autoinunurle)、皮膚も参照）(610) 651-6000
Humira（商標） アダリムマブ MDX-066 （CDA-1）	Abbott Laboratories 社 イリノイ州アボットパーク Medarex 社 ニュージャージー州プリンストン	クローン病フェーズ III （自己免疫、皮膚も参照） (847) 9361189 クロストリジウム・ディフィシレ病

10

20

30

40

MDX-1100	Millennium Pharmaceuticals 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	潰瘍性大腸炎
Nuvion（商標） ビジリズマブ	PDT, BioPharma 社 カリフォルニア州フリーモント	静脈内（I.V.）ステロイド難治性潰瘍性大腸炎 クローン病
Tysarbi（商標） ナタリズマブ	Biogen Idec 社 マサチューセッツ州ケンブリッジ	クローン病
眼の症状		
ゴリムマブ	Centocor 社 ペンシルバニア州ホーシャム	ブドウ膜炎（自己免疫も参照）
遺伝的疾患		
Soliris（商品名） エクリズマブ（オーファンドラッグ）	Alexion Pharmaceuticals 社 コネチカット州チェシャイアー	発作性夜間血色素尿症（PNH）
神経学的疾患		
RN624	Rinat Neuroscience 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	変形性関節症痛
RN1219	Rinat Neuroscience 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ	アルツハイマー病
呼吸器疾患		
ABN 912	Novartis Pharmaceuticals 社 ニュージャージー州イーストハノーバー	喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）
ABX-IL8	Amgen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	COPD
AMG 317	Amgen 社 カリフォルニア州サウザンドオークス	喘息
ダクリズマブ （抗 CD25 MAb）	Protein Design Labs 社 カリフォルニア州フリーモント Roche 社 ニュージャージー州ナットリー	喘息（自己免疫も参照）
MEDI-528 抗 TL-9 MAb	MedImmune 社 メリーランド州ゲイザースバーグ	喘息
メポリズマブ （抗 TL5 MAb）	GlaxoSmithKline 社 ペンシルベニア州フィラデルフィア Rsch 社 ノースカロライナ州トライアングルパーク	喘息及び鼻ポリープ症（その他も参照）
TNX-832	Tanox 社 テキサス州ヒューストン	呼吸器疾患
Xolair（商標） オマリズマブ	Genentech 社 カリフォルニア州サウスサンフランシスコ Novartis Pharmaceuticals 社	小児喘息 （その他も参照）
皮膚疾患		
Raptiva（商標） エファリズマブ CNTO1275	Genentech 社 XOMA 社 Centocor 社	慢性の中等度から重度のプラーク乾癬 乾癬 自己免疫、消化器も参照）
Humira（商標） アダリムマブ	Abbott Laboratories 社	乾癬 自己免疫、消化器も参照）
TRX 4	TolerRx 社	乾癬 （糖尿病も参照）
移植		

10

20

30

40

ORTHOCLONE OKT（商標）3ムロモナブ－ CD3	Ortho Biotech社	急性腎臓移植拒絶反応、心臓及び肝臓移植拒絶反応の逆転
Simulect（商標） バシリキシマブ	Novartis Pharmaceuticals社	腎臓移植拒絶反応の防止
Zenapax（商標） ダクリズマブ OKT3－ガンマ－1	Roche社 Protein Design Labs社 Johnson & Johnson社	急性腎臓移植拒絶反応の予防 腎臓移植拒絶反応 （自己免疫、糖尿病も参照）
その他		
NeutroSpec（商品名） テクネチウム99m Tc ファノレソマブ	Palatin Technologies社	虫垂炎の診断
CR 0002	CuraGen社	腎炎
デノスマブ （AMG 162）	Amgen社	閉経後骨粗しょう症、自己免疫及び癌も参照
メポリズマブ (anti-IL5 MAb)	GlaxoSmithKlIne社	過好酸球増加症候群、好酸球性食道炎（呼吸器も参照）
Xolair（商標） オマリズマブ	Genentech社 Tanox社	ピーナッツアレルギー（呼吸器も参照）

10

【０１５６】
ＶＩ．治療及び治療のモニタリング
　本明細書に記載の方法に従って、抗ＴＮＦα薬治療を受けている被験者の診断又は予後診断が決定されれば、又は、ＴＮＦαが病態生理に関与するとされている疾病及び疾患、例えば、限定的でなく、ショック、敗血症、感染、自己免疫疾患、ＲＡ、クローン病、移植片拒絶及び移植片対宿主病、と診断された個体における抗ＴＮＦα薬に対する応答の可能性が予測されれば、本発明はさらに、その診断、予後診断、又は予測に基づく治療過程を推奨することを含んでいることができる。或る場合に、本発明はさらに、ＴＮＦ－αが病態生理に関与するとされている疾病及び疾患と関連した１種又は２種以上の症状を治療するのに有効な抗ＴＮＦα薬の治療的有効量をその個体に投与することを含んでいることができる。治療適用のために、抗ＴＮＦα薬は単独で又は追加の抗ＴＮＦα薬１種又は２種以上及び／又は抗ＴＮＦα薬に関連した副作用を低減する薬剤（例えば、免疫抑制薬）１種又は２種以上と組み合わせて同時投与することができる。抗ＴＮＦα薬の例は本明細書中に記載したが、その例として限定的でなく、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、ＥＮＢＲＥＬ（商品名）（エタネルセプト）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）、ＣＩＭＺＩＡ（商標）（セルトリズマブ ペゴル）、生物学的薬剤、通常の薬剤、及びそれらの組み合わせを挙げることができる。このようにして、本発明は好適に、治療決定を導きそして適正な薬剤が適正な患者に適正な時間に与えられるように抗ＴＮＦα薬に対する最適化及び治療選択を知らせることによって臨床医が「個別化医療」を行うことを可能にする。

20

30

【０１５７】
　抗ＴＮＦα薬は、必要に応じて適当な医薬賦形剤と共に投与することができ、そして任意の許容される投与方法によって行うことができる。従って、投与は、例えば、静脈内、局所的、皮下的、経皮的（transcutaneous）、経皮性（transdermal）、筋肉内、経口的、経頬的、舌下、歯内、経口蓋、関節内、非経口的、動脈内、皮内、心室内（intraventricular）、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻腔内、直腸内、膣内又は吸入によるものであることができる。「同時投与」とは、抗ＴＮＦα薬を、第二薬（例えば、別の抗ＴＮＦα薬、抗ＴＮＦα薬の副作用を低減するのに有用な薬剤など）と同時に、その直前に、又はその直後に投与することを意味する。

40

【０１５８】
　治療的有効量の抗ＴＮＦα薬は、繰り返して、例えば、少なくとも２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、又は９回以上にわたり投与することができ、又はその用量を持続点滴によって投与することができる。投与は、固体、半固体、凍結乾燥粉末、又は液体

50

の剤形、例えば、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁液、乳濁液、坐剤、停留浣腸、クリーム、軟膏、ローション、ゲル、エアロゾル、フォーム（foams）等の形態を、好ましくは、正確な投与量の単一投与に適した単位剤形でとることができる。

【０１５９】

用語「単位剤形」は、本明細書中で用いる場合、ヒト被験者及び他の哺乳動物に対する単位投与量として適当な物理的に個別の単位を含み、各単位は、望ましい作用発現、忍容性、及び／又は治療効果をもたらすように計算された所定量の抗ＴＮＦα薬を適当な医薬賦形剤と共に含む（例えば、アンプル）。さらに、より濃厚にされた剤形を製造することができ、次にその剤形からより希釈された単位剤形を調製することができる。このように、より濃厚にされた剤形は、抗ＴＮＦα薬の量より実質的に多い量、例えば、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、又はそれを超える倍数の量を含む。

【０１６０】

前記のような剤形の製造方法は当業者に公知である（例えば、REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)参照）。剤形は、典型的には、通常の薬剤学的担体又は賦形剤を含んでおりそしてさらに他の医薬剤、担体、アジュバント、希釈剤、組織透過促進剤（tissue permeation enhancer）、可溶化剤などを含んでいることができる。適切な賦形剤は、当該技術分野で周知の方法によって、特定の剤形及び投与経路に合せることができる（例えば、REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES、前出）。

【０１６１】

適当な賦形剤の例として、限定的でなく、ラクトース、デキストロース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリアクリル酸、例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ、例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９４１、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８０、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８１等を挙げることができる。剤形はさらに、潤滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び鉱油など；湿潤剤；乳化剤；懸濁剤；保存剤、例えば、メチル−、エチル−、及びプロピル−ヒドロキシ−ベンゾエート（すなわち、パラベン）など；ｐＨ調整剤、例えば、無機及び有機の酸及び塩基；甘味料；及び香味料を含んでいることができる。剤形は、生分解性ポリマビーズ、デキストラン、及びシクロデキストリン包接錯体も含んでいることができる。

【０１６２】

経口投与について、治療的に有効な投与は、錠剤、カプセル剤、乳濁液、懸濁液、水剤、シロップ剤、噴霧剤、ロゼンジ、散剤、及び徐放性製剤の形態であることができる。経口投与に適した賦形剤として、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカン、セルロース、グルコース、ゼラチン、ショ糖、及び炭酸マグネシウム等を挙げることができる。

【０１６３】

或る実施形態において、治療的に有効な投与は、丸剤、錠剤、又はカプセル剤の形態をとり、そしてこのように、剤形は抗ＴＮＦα薬と共に、任意の以下の成分を含んでいることができる：希釈剤、例えば、ラクトース、ショ糖、リン酸二カルシウムなど；崩壊剤、例えば、デンプン又はその誘導体など；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム等；及び結合剤、例えば、デンプン、アカシアガム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース及びその誘導体など。抗ＴＮＦα薬は、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）担体中に配置された（disposed）坐剤に製剤化することもできる。

【０１６４】

液体剤形は、担体、例えば、生理食塩水（例えば、塩化ナトリウム０．９％ｗ／ｖ）、

水性デキストロース、グリセロール、エタノール等の中に抗ＴＮＦα薬及び場合により１種又は２種以上の薬剤学的に許容することのできるアジュバントを溶解又は分散させて、例えば、経口的、局所的、又は静脈内投与のための、溶液又は懸濁液を形成することにより製造することができる。抗ＴＮＦα薬は、停留浣腸に製剤化することもできる。

【０１６５】

局所的投与について、治療的に有効な投与は、乳濁液、ローション、ゲル、フォーム、クリーム、ゼリー、水剤、懸濁液、軟膏、及び経皮パッチの形態であることができる。吸入による投与について、抗ＴＮＦα薬は乾燥粉末として又はネブライザーを介して液体の形態で送達することができる。非経口的投与について、治療的に有効な投与は、滅菌された注射溶液及び滅菌包装された散剤の形態であることができる。好ましくは、注射溶液は、ｐＨ約４．５～約７．５で製剤化される。

10

【０１６６】

治療的に有効な投与は、凍結乾燥された形態で提供することもできる。かかる剤形は、投与前の再構成のために、緩衝剤、例えば、炭酸水素塩、を含んでいることができ、又は、例えば、水による再構成のために凍結乾燥の剤形中に緩衝剤を含んでいることができる。凍結乾燥の剤形はさらに、適当な血管収縮剤、例えば、エピネフリン、を含んでいることができる。凍結乾燥の剤形は、再構成された剤形を直ちに個体に投与することができるように、場合により再構成用の緩衝剤と一緒に包装されたシリンジにより提供することができる。

【０１６７】

20

病態生理においてＴＮＦαが関与するとされる疾病及び疾患の治療に対する治療的使用において、抗ＴＮＦα薬は初回投与量一日当たり約０．００１ｍｇ／ｋｇ～約１０００ｍｇ／ｋｇで投与することができる。一日量範囲で約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約２００ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、又は約１０ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇを用いることができる。しかしながら、投与量は、個体、疾病、疾患、又は症状の重症度、及び用いられる抗ＴＮＦα薬の要件に基づいて変化させることができる。例えば、本明細書に記載の方法に従って疾病、疾患、及び／又は症状の種類及び重症度を考慮して投与量を経験的に決定することができる。本発明に照らすと、個体に投与される用量は、その個体において経時的に有利な治療応答を与えるのに充分な量であるべきである。投与量の大きさは、個体における特定の抗ＴＮＦα薬の投与に伴う任意の有害な副作用の存在、性質、及び程度によって決定することもできる。特定の状態に対する適正な投与量の決定は、医師の技能の範囲内である。一般に、治療は、抗ＴＮＦα薬の最適用量より少ない低用量で開始される。その後、状況に応じて最適な効果が達成されるまで投与量は少しずつ増やされる。便宜のために、望ましい場合には、一日の全投与量をその一日間でいくつかの部分に分けて投与することができる。

30

【０１６８】

用語「抗ＴＮＦα薬」は、本明細書中で用いる場合、病態生理においてＴＮＦ－αが関与するとされる疾病及び疾患と関連した１種又は２種以上の症状を治療するのに有効な薬剤の薬剤学的に許容することのできるあらゆる形態を包含する。例えば、抗ＴＮＦα薬は、ラセミ又は異性体混合物、又はイオン交換樹脂に結合した固体複合体（solid complex）等であることができる。さらに、抗ＴＮＦα薬は溶媒和物の形態であることができる。この用語は、記載されている抗ＴＮＦα薬の薬剤学的に許容することのできるあらゆる塩、誘導体、及び類似体だけでなく、それらの組み合わせも含むことも意図している。例えば、抗ＴＮＦα薬の薬学的に許容することのできる塩として、限定的でなく、その酒石酸塩、コハク酸塩、タルタレート（tartarate）、バイタルタレート（bitartarate）、二塩酸塩、サリチル酸塩、ヘミコハク酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、塩酸塩、カルバミン酸塩、硫酸塩、硝酸塩、及び安息香酸塩の形態だけでなく、それらの組み合わせ等も挙げることができる。任意の形態の抗ＴＮＦα薬、例えば、抗ＴＮＦα薬の薬剤学的に許容することのできる塩、抗ＴＮＦα薬の遊離塩基、又はそれらの混合物が本発明の方法に用いるのに適している。適当な抗ＴＮＦα薬の例として、限定的でなく、生物学的薬剤、通常

40

50

の薬剤、及びそれらの組み合わせを挙げることができる。
【０１６９】
　治療薬は、例えば、抗サイトカイン及びケモカイン抗体、例えば、抗腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）抗体などを含む。抗ＴＮＦα抗体の限定的でない例として以下を挙げることができる：キメラモノクローナル抗体、例えば、キメラＩｇＧ１抗ＴＮＦαモノクローナル抗体である、インフリキシマブ（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標））（Centocor社；ペンシルバニア州ホーシャム）など；ヒト化モノクローナル抗体、例えば、ＣＤＰ５７１及びペグ化されたＣＤＰ８７０など；完全ヒトモノクローナル抗体、例えば、アダリムマブ（Ｈｕｍｉｒａ（商標））（Abbott Laboratories社；イリノイ州アボットパーク）など；ｐ７５融合タンパク質、例えば、エタネルセプト（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））（Amgen社；カリフォルニア州サウザンドオークス；Wyeth Pharmaceuticals社；ペンシルバニア州カレッジビル）、小分子（例えば、ＭＡＰキナーゼ阻害剤）；及びそれらの組み合わせ。Ghosh, Novartis Found Symp., 263:193-205 (2004)参照。
【０１７０】
　他の生物学的薬剤として、例えば、抗細胞接着（anti-cell adhesion）抗体、例えば、細胞接着分子α４－インテグリンに対するヒト化モノクローナル抗体である、ナタリズマブ（Ｔｙｓａｂｒｉ（商標））（Elan Pharmaceuticals社；アイルランド ダブリン；Biogen Idec社；マサチューセッツ州ケンブリッジ）、及びヒト化ＩｇＧ１抗α４β７－インテグリンモノクローナル抗体である、ＭＬＮ－０２（Millennium Pharmaceuticals社；マサチューセッツ州ケンブリッジ）など；抗Ｔ細胞剤；抗ＣＤ３抗体、例えば、ヒト化ＩｇＧ２Ｍ３抗ＣＤ３オノクローナル抗体（onoclonal antibody）である、ビシリズマブ（Ｎｕｖｉｏｎ（商標））（PDL BioPharma社；ネバダ州インクラインビレッジ）など；抗ＣＤ４抗体、例えば、キメラ抗ＣＤ４モノクローナル抗体である、プリリキシマブ（ｃＭ－Ｔ４１２）（Centocor社；ペンシルバニア州ホーシャム）など；抗ＩＬ－２受容体アルファ（ＣＤ２５）抗体、例えば、ヒト化ＩｇＧ１抗ＣＤ２５モノクローナル抗体である、ダクリズマブＺｅｎａｐａｘ（商標））（PDL BioPharma社；ネバダ州インクラインビレッジ；Roche社；ニュージャージー州ナットリー）、及びキメラＩｇＧ１抗ＣＤ２５モノクローナル抗体である、バシリキシマブ（Ｓｉｍｕｌｅｃｔ（商標））（Novartis社；スイス、バーゼル)など；それらの組み合わせを挙げることができる。
【０１７１】
　周期的な時間間隔で個体を監視して、該個体の試料から診断、予後診断及び／又は予測情報が得られれば所定の治療レジメンの効果を評価することもできる。例えば、治療抗体及び／又は該治療抗体に向けられた（directed to）自己抗体の存在又は濃度レベルは、治療抗体を用いた治療の治療効果に基づいて変化することがある。或る場合には、患者を監視して、個別化されたアプローチにおける応答を評価し及び所定の薬剤又は治療の効果を理解することができる。さらに、患者は薬剤に応答しないこともあるが、抗体レベルが変化することがあり、このことはこれらの患者が患者の抗体レベルによって同定することができる特別な集団（応答を示さない）に属していることを示唆する。これらの患者には、目下の治療を中止し、そして代わりの治療を処方することができる。
【０１７２】
　周期的な時間間隔で個体を監視して、種々の抗体の濃度又はレベルを評価することもできる。種々の時点での抗体レベル、並びに抗体レベルの経時的な変化率は重要である。或る場合には、個体における閾値量を超えた１種又は２種以上の抗体（例えば、抗ＴＮＦα抗体に対する自己抗体）の増加率は、該個体が有意に高い合併症を発現するリスク又は副作用のリスクを有していることを示す。マーカー速度（すなわち、或る時間期間にわたる抗体レベルの変化）の形で連続的な検査から得られる情報は、疾病の重症度、疾病の合併症のリスク、及び／又は副作用のリスクと関連づけることができる。
【０１７３】
　本発明の方法は、例えば、治療モノクローナル抗体を用いた治療に対して、一次（primary）無応答者又は低応答者を同定することも備えている。これらの一次無反応者又は低

反応者は、例えば、治療薬に対する先天性の又は前に発現した（pre-developed）イムノグロブリン応答を偶然に有している患者であることがある。治療薬が診断用抗体である場合、一次無応答者又は低応答者の同定は、各個別患者に対する適当な治療薬の選択を確実にすることができる。

【０１７４】

本発明に係る方法は、例えば、二次応答不全（secondary response failure）を有する患者を同定するのに用いることができる。二次応答不全は無症候性であることがあり、すなわち、治療の効果が低下してきた又は効果がなくなったことが唯一の徴候となる。或る場合に、本発明の方法は、患者又は医師が治療効果が少ないことに気付くより前に二次応答不全の発現を同定するのに有効である。より多量の治療投与量を付与して正確なインビボ濃度が達成されることを確実にすることができ、又は代わりの治療を選択することができ、又はそれらを組み合わせることができる。治療薬が診断薬である場合、二次応答不全の発現はとりわけ取り返しのつかない（catastrophic）ことになることがある。疾病／薬剤のサイズ及び／又は位置を決定することが、例えば、いずれかの二次転移の存在及び／又は位置を同定するのに、重要である場合、癌などの疾病、及び一部の感染症の監視に放射標識されたモノクローナル抗体がルーチン的に用いられる。気付かずに応答不全（一次又は二次）の発現が生じている場合、患者は「問題なしという診断（all clear）」、すなわち、誤った陰性結果を受けることがあり、これは治療の中止を導いて今後の疾病の再発を招き、疾病がずっと進行してしまい場合によっては治療することのできない状態となることがある。

【０１７５】

別のカテゴリーの応答不全は、不利な副作用と関連した（例えば、二次）応答不全の発現である。被験者における宿主免疫応答の発現は有害な又は不快な副作用を伴うことがある。これらは、ヒト又はヒト化治療薬を認識するが他の宿主イムノグロブリンとの間の識別ができない抗体の発現によって引き起こされることがある。従って、本発明の方法は、前記治療薬に対する先天性の又は前に発現したイムノグロブリン応答のいずれかを有する被験者及び、例えば、応答不全に関連した不利な副作用を受けやすいことがある被験者を同定するのに適している。

【０１７６】

本発明の方法は、患者へのモノクローナル治療薬の投与を伴う治療レジメンの選択及び管理に適している。従って、本明細書中に記載した治療抗体の濃度又はバイオアベイラビリティを決定する方法を、疾病又は疾患の治療方法に組み込むことができる。治療的処置の過程の間に本発明の方法を用いて患者の免疫学的状態を監視することによって、高価な治療薬をコスト効果的に用いることを確保しながら、患者に最大の治療利益を保証できるように治療薬の選択及び／又は投与を適合させることができる。

【０１７７】

本発明の方法を用いて、患者が治療薬（例えば、治療抗体）の変更された投与量レジメン又は代わりの医薬治療のいずれを必要としているかを決定することができる。

【０１７８】

本発明の方法はさらに、患者の治療薬（例えば、治療抗体）の血清濃度又はバイオアベイラビリティの周期的評価を含んでいることができる。

【０１７９】

本発明の方法は、被験者が治療抗体などの治療薬に対する免疫応答を発現したか否かを決定する工程も備えている。

【０１８０】

本発明の方法は、患者における治療応答の欠如が治療抗体、例えば、抗ＴＮＦα抗体など、に対する患者由来のイムノグロブリンの形成によるものか否かを決定することも備えている。

【０１８１】

本発明はさらに、治療抗体を用いて治療することのできる疾病を患う患者に対して適切

な薬剤治療を選択する方法を備えている。
【０１８２】
本発明は、患者が治療抗体に二次応答不全を発現するか否かの可能性を決定する予後診断方法も備えている。
【０１８３】
ＶＩＩ．実施例
特定の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。以下の実施例は説明の目的で提供するものであり、いかなる仕方によっても本発明を限定しようとするものではない。当業者であれば、本質的に同じ結果を得るように変更し又は改変することができる種々の非臨界的パラメータを容易に認識するであろう。
【０１８４】
実施例１．抗ＴＮＦα生物学的製剤のレベルを測定するための新規なモビリティシフトアッセイ
本例は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて蛍光標識されたＴＮＦαへの抗ＴＮＦα薬の結合を検出する、患者試料（例えば、血清）中の抗ＴＮＦα薬濃度を測定するための新規なホモジニアスアッセイを説明する。このアッセイは、洗浄工程の必要をなくし、バックグランド及び血清干渉の問題を低減させる可視及び／又は蛍光スペクトルによる検出を可能にするフルオロフォアを使用し、高感度の蛍光標識検出によって低力価で患者中の抗ＴＮＦα薬を検出する能力を増大させ、そして液相反応として生じることによって、ＥＬＩＳＡプレートなどの固体表面への結合によるエピトープの任意の変化の機会を低減させるので、有利である。
【０１８５】
１つの典型的な実施形態によれば、フルオロフォア（例えば、Ａｌｅｘａ$_{６４７}$）を用いてＴＮＦαを標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はそれらの双方によって検出することができる。標識されたＴＮＦαを液相反応によりヒト血清とインキュベートして、血清中に存在する抗ＴＮＦα薬を結合させる。標識されたＴＮＦαを液相反応により既知量の抗ＴＮＦα薬とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識されたＴＮＦαへの抗ＴＮＦα薬の結合は、標識されたＴＮＦα単独に比べてピークを左側にシフトさせる。次いで、血清試料中に存在する抗ＴＮＦα薬の濃度を検量線及び対照と比べることができる。
【０１８６】
図１は、サイズ排除ＨＰＬＣを用いてＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$とＨＵＭＩＲＡ（商品名）（アダリムマブ）との結合を検出する本発明のアッセイの例を示している。図１に示すように、ＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$へのＨＵＭＩＲＡ（商品名）の結合は、ＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のピークを左側へシフトさせた。
【０１８７】
図２は、ＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$へのＨＵＭＩＲＡ（商品名）の結合の用量反応曲線を示す。とりわけ、図２Ａは、サイズ排除クロマトグラフィーアッセイにおいてＨＵＭＩＲＡ（商品名）が用量依存的にＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のシフトを増加させたことを示す。図２Ｂは、１％ヒト血清の存在がサイズ排除クロマトグラフィーアッセイにおいてＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のシフトに有意な影響を及ぼさなかったことを示す。図２Ｃは、プールされたＲＦ陽性血清の存在がサイズ排除クロマトグラフィーアッセイにおいてＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のシフトに有意な影響を及ぼさなかったことを示す。
【０１８８】
このように、本例は、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）などの抗ＴＮＦα薬を受けている患者を監視して：（１）適切な薬剤投与量の決定に導き；（２）薬剤の薬物動態を評価し、例えば、薬剤が体内からどれだけ急速に排出されていくかを決定し；及び（３）治療法、例えば、目下の抗ＴＮＦα薬から異なるＴＮＦα阻害剤へ又は別の種類の治療へ切り替えるか否か、の決定を導く上での本発明の有用性を示している。

10
20
30
40
50

【０１８９】
実施例２．ＨＡＣＡ及びＨＡＨＡレベルを測定するための新規なモビリティシフトアッセイ
本例は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて蛍光標識された抗ＴＮＦα薬への自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ及び／又はＨＡＨＡ）の結合を検出して、患者試料（例えば、血清）中の前記自己抗体濃度を測定するための新規なホモジニアスアッセイを説明する。このアッセイは、低親和性のＨＡＣＡ及びＨＡＨＡを除去する洗浄工程の必要をなくし、バックグランド及び血清干渉の問題を低減させる可視及び／又は蛍光スペクトルによる検出を可能にするフルオロフォアを使用し、高感度の蛍光標識検出によって低力価で患者中のＨＡＣＡ及びＨＡＨＡを検出する能力を増大させ、そして液相反応として生じることによって、ＥＬＩＳＡプレートなどの固体表面への結合によるエピトープの任意の変化の機会を低減させるので、有利である。
【０１９０】
ＴＮＦα阻害剤に対して産生される自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ、ＨＡＨＡ等）を測定することの臨床的有用性は、インフリキシマブ１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇを用いて治療された慢性関節リウマチの患者の５３％、２１％、及び７％にＨＡＣＡが検出されたという事実によって説明される。インフリキシマブをメトトレキセートと組み合わせた場合、抗体の発生率は下がって１５％、７％、及び０％となったが、このことは併用の免疫抑制治療が抗薬剤応答を低下させるのに効果的であることを示しているが、高用量の抗ＴＮＦα薬は耐性を生じさせることがあることも示している。クローン病において、さらに高い発生率が報告された；５回の注入後、６１％の患者がＨＡＣＡを有していた。ＨＡＣＡが存在する場合には臨床応答が短縮化された。Rutgeerts, N. Engl. J. Med., 348:601-608 (2003)参照。１５５人の患者において２００５年から２００８年の３年間の期間にわたり測定されたインフリキシマブ及びＨＡＣＡレベルの遡及研究は、炎症性腸疾患の患者の２２．６％（Ｎ＝３５）にＨＡＣＡが検出されたことを示した。Afif et al., “Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Levels in Patients with Inflammatory Bowel Disease”; Digestive Disease Weekに示された論文；May 30-June 3, 2009; Chicago, IL参照。著者らは、臨床症状だけに基づいて治療法を変更することは不適切な管理に帰することがあると結論した。
【０１９１】
このホモジニアスモビリティシフトアッセイは、患者試料中の自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ及び／又はＨＡＨＡ）濃度を測定するための図３に示した架橋アッセイなどの現行法より有利であるが、それは本発明の方法が、ＥＬＩＳＡプレート由来の固相干渉及び非特異的結合なしに、抗ＴＮＦα薬由来の干渉（例えば、架橋アッセイの場合、抗ＴＮＦα薬トラフレベルにおいてＨＡＣＡ測定を行わなければならない）なしに、かつ抗体の多価（multivalency）への依存性（例えば、ＩｇＧ４抗体は、ＩｇＧ４抗体がバイスペシフィックであり同一の抗原を架橋することができないので架橋アッセイを用いて検出されない）なしに、ＨＡＣＡなどの自己抗体の濃度を測定することができるからである。このように、本発明は、現行法に勝る少なくとも以下の利点を有する：固体表面への抗原の結合を回避し（変性回避）；ＩｇＧ４効果（effect）を除去し；治療抗体トラフ問題を克服し；弱親和性を有する抗体を検出し；無関係のＩｇＧ類の非特異的結合を除去し；そして検出の感度及び特異性を高める。
【０１９２】
１つの典型的な実施形態において、抗ＴＮＦα薬（例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））をフルオロフォア（例えば、Ａｌｅｘａ$_{647}$）で標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はそれらの双方で検出することができる。液相反応により標識された抗ＴＮＦα薬をヒト血清とインキュベートして、血清中に存在するＨＡＣＡ及びＨＡＨＡを結合させる。液相反応により標識された抗ＴＮＦα薬を既知量の抗ＩｇＧ抗体とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識された抗ＴＮＦα薬への自

己抗体の結合は、標識された薬剤単独に比べてピークの左側へのシフトを生じさせる。次いで、血清試料中に存在するＨＡＣＡ及びＨＡＨＡの濃度を検量線及び対照と比較することができる。図４は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）に対して産生されたＨＡＣＡ／ＨＡＨＡの濃度を測定するための本発明の自己抗体検出アッセイの典型的な概略を示す。或る場合に、高いＨＡＣＡ／ＨＡＨＡレベルは、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を用いた目下の治療をＨＵＭＩＲＡ（商品名）などの別の抗ＴＮＦα薬に切り替えるべきことを示している。

【０１９３】

このアッセイの原理は、サイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）上での抗体結合したＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）複合体対フリーのＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の、複合体の分子量の増加によるモビリティシフトに基づく。

【０１９４】

本例のクロマトグラフィーは、分子量分画範囲５，０００～７０，０００及び移動相１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．４、流速０．５ｍＬ／ｍｉｎを有し６５０ｎｍにおけるＵＶ検出を備えたＢｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００カラム（Phenomenex社）を用いて、Ａｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムにより実施した。Ｂｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍを用いたＡｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムの前のＳＥＣ－３０００カラムは、ＢｉｏＳｅｐ　７５ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００である分析用プレカラムである。各分析に対して、試料体積１００μＬをカラム上にロードする。

【０１９５】

ＳＥ－ＨＰＬＣ分析の前に１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３の溶出バッファ中で室温において１時間にわたり既知量の抗体とＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）とをインキュベートすることによって、抗体結合したＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）複合体を形成する。

【０１９６】

図５は、本発明のサイズ排除クロマトグラフィーアッセイを用いて検出された、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ヒトＩｇＧ抗体結合の用量反応分析を示す。ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ＩｇＧ抗体の結合は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のピークを左側へシフトさせた。図６は、本発明のサイズ排除クロマトグラフィーアッセイを用いて検出された、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ヒトＩｇＧ抗体結合の第二の用量反応分析を示す。より多量の抗ＩｇＧ抗体は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のピークの左側へのシフトによって示されるように、抗ＩｇＧ／ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$の複合体の形成の用量依存性の増加をもたらした。図７は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への抗ＩｇＧ抗体結合の用量反応曲線を示す。

【０１９７】

図８は、注入試料１００μＬで本発明のサイズ排除クロマトグラフィーアッセイを用いて検出された正常ヒト血清及びＨＡＣＡ陽性血清中のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$免疫複合体形成を示す。図８に示すように、患者試料中に存在するＨＡＣＡのＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$への結合は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$のピークを左側へシフトさせた。このように、本発明のサイズ排除クロマトグラフィーアッセイは、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の存在下でＨＡＣＡを測定し、患者が治療中の間に利用することができ、弱いＨＡＣＡ結合及び強いＨＡＣＡ結合の双方を測定し、ミックスアンドリードモビリティシフトアッセイであり、そして標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を用いてＨＡＣＡ及びＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）と平衡化する（equilibrate）他のアプローチまで拡張することができるので、とりわけ有利である。

【０１９８】

図９は、架橋アッセイ及び本発明のモビリティシフトアッセイを用いて実施した２０の

患者血清試料からのＨＡＣＡ測定の要約を提供する。この比較試験は、本発明の方法が現行法より高い感度を有していることを示しているが、その理由は架橋アッセイを用いて測定した場合にＨＡＣＡ陰性であった３つの試料が本発明のモビリティシフトアッセイを用いて測定すると実際にはＨＡＣＡ陽性であったからである（患者番号ＳＫ０７０７０３０５、ＳＫ０７０７０５９５、及びＳＫ０７１１００３５参照）。

【０１９９】

このように、本例は、抗ＴＮＦα薬（例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））を受けている患者を監視して薬剤に対する自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ及び／又はＨＡＨＡ）の存在又はレベルを検出することにおける本発明の有用性を証明するものであるが、それはかかる免疫応答が薬剤を用いたさらなる治療を妨げる抗ＴＮＦα薬の薬物動態及び生体内分布における劇的な変化及び過敏性反応と関連していることがあるからである。

【０２００】

結論として、実施例１及び２は、Ａｌｅｘａ$_{６４７}$を用いてＴＮＦα及び抗ＴＮＦα抗体を有効に標識することができることを示している。標識されたＴＮＦα－Ａｌｅｘａ$_{６４７}$を抗ＴＮＦα抗体とインキュベートした場合、標識されたＴＮＦα／抗ＴＮＦα薬複合体のリテンションタイムはシフトされ、そして該シフトを生じさせた抗ＴＮＦα薬の量はＨＰＬＣを用いて定量化することができた。さらに、標識された抗ＴＮＦα薬を抗ヒトＩｇＧ抗体とインキュベートした場合、標識された抗ＴＮＦα薬／抗ＩｇＧ抗体複合体のリテンションタイムはシフトされ、そして該シフトを生じさせた抗ＩｇＧ抗体の量はＨＰＬＣを用いて定量化することができた。さらに、アッセイ系における少ない血清量（low serum content）はＨＰＬＣ分析にほとんど影響を及ぼさないことが示された。最後に、抗ＴＮＦα薬及びＨＡＣＡ／ＨＡＨＡアッセイについて検量線を作成することができ、それを用いて患者血清中の抗ＴＮＦα薬又はＨＡＣＡ／ＨＡＨＡレベルを定量化することができた。有利なことに、本発明は或る側面において、モビリティーシフトアッセイ、例えば、薬剤及び該薬剤に対する抗体の双方を測定すべく開発されたホモジニアスミックスアンドリードアッセイなど、を提供する。抗ＴＮＦα生物学的製剤であるＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及びＨＵＭＩＲＡについての検量線を作成し、そしてＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）に対するＨＡＣＡ抗体についての検量線も作成した。このモビリティーシフトアッセイフォーマットは、ＥＬＩＳＡとは異なり、固体表面への抗原のコーティングを排除しそして無関係なＩｇＧ類の非特異的結合による影響を受けない。アッセイフォーマットは単純であるが、極めて感度が高いのであらゆる抗ＴＮＦα生物学的薬剤（例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、ＨＵＭＩＲＡ、Ｅｎｂｒｅｌ及びＣｉｍｚｉａ）並びに患者血清中の中和抗体（抗ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））を検出するのに用いることができる。

【０２０１】

実施例３．新規なモビリティシフトアッセイを用いた患者血清中のヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）及びインフリキシマブ（ＩＦＸ）レベルの測定

要約

背景：インフリキシマブ（ＩＦＸ）は、自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチ（ＲＡ）及び炎症性腸疾患（ＩＢＤ）など、を治療するのに有効であることが示されているＴＮＦαに対するキメラモノクローナル抗体治療薬である。しかしながら、ヒトキメラ抗体（ＨＡＣＡ）の検出を通して一部のＩＦＸ治療された患者にＩＦＸに対する抗体が見出されたが、これは薬剤の効果を低下させまたは逆の作用を引き起こすことがある。個々の患者においてＨＡＣＡ及びＩＦＸレベルを監視することは、ＩＦＸを用いた投薬及び治療を最適化するのに役立つことができる。ＨＡＣＡを検出するための現行法は固相アッセイであるが、これは循環血液中のＩＦＸの存在がＨＡＣＡの存在をマスクすることがあるという事実による制限があるので、ＩＦＸの投与の少なくとも８週間後にならないと測定することができない。さらに、この時間経過は、循環血液中の高分子量免疫複合体の急速なクリアランスのため、アッセイを混乱させる。これらの欠点を克服するため、本発明者らは、ＩＦＸを用いて治療された患者の血清中ＩＦＸ及びＨＡＣＡレベルを測定するための新規な方法を開発し評価した。

10

20

30

40

50

【０２０２】
方法：新規な非放射性標識で液相のサイズ排除（ＳＥ）－ＨＰＬＣモビリティシフトアッセイを開発して、ＩＦＸを用いて治療された患者由来の血清中のＨＡＣＡ及びＩＦＸレベルを測定した。免疫複合体（例えば、ＴＮＦα／ＩＦＸ又はＩＦＸ／ＨＡＣＡ）、フリーのＴＮＦα又はＩＦＸ、及び結合／フリーの比を高感度で分解して計算することができる。種々の濃度のＩＦＸ又はプールＨＡＣＡ陽性血清とインキュベートすることによって作成した検量線を用いて血清中ＩＦＸ又はＨＡＣＡ濃度を決定した。この新規なアッセイを用いて、本発明者らは、ＩＦＸを用いて治療された再発ＩＢＤ患者から採取した血清中のＩＦＸ及びＨＡＣＡレベルを測定しそして従来の架橋（Bridge）ＥＬＩＳＡアッセイによって得られたそれらに関する結果と比較した。

【０２０３】
結果：高感度のこの新規なアッセイから用量反応曲線を作成した。過剰のＩＦＸの存在下にＨＡＣＡの検出が示された。ＩＦＸを用いて治療された患者由来の１１７の血清試料において、６５の試料が検出限界を超えるＩＦＸレベルを有していることが見出され、平均値は１１．０＋６．９ｍｇ／ｍＬであった。ＨＡＣＡレベルについては、３３（２８．２％）の試料が陽性であることが見出されたが、一方で、架橋ＥＬＩＳＡアッセイは２４の陽性試料だけを検出した。本発明者らは、架橋アッセイによって決定された試料から９の誤（false）陰性及び９の誤陽性も同定した。ＩＦＸ治療の過程の間に１１人の患者でＨＡＣＡレベルが増加したことを見出したと同時に、ＩＦＸレベルが有意に低下したことを見出した。

【０２０４】
結論：新規な非放射性標識で液相のモビリティシフトアッセイを開発して、ＩＦＸを用いて治療された患者由来の血清中のＩＦＸ及びＨＡＣＡレベルを測定した。このアッセイは高い感度及び正確度を有しており、そして得られた結果は再現性があった。この新規なアッセイは、有利なことに、患者が治療中の間にＨＡＣＡ及びＩＦＸを測定するのに用いることができる。

【０２０５】
序論

　腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）は、自己免疫疾患、例えば、クローン病（ＣＤ）及び慢性関節リウマチ（ＲＡ）など、の病因の中心的役割を演ずる。治療抗体、例えば、インフリキシマブ（ヒト－マウスキメラモノクローナルＩｇＧ１κ）又はアダリムマブ（完全ヒトモノクローナル抗体）など、を用いたＴＮＦαの遮断はＣＤ及びＲＡにおける疾病活性を低下させることが充分に実証されている。しかしながら、患者の約３０～４０％は抗ＴＮＦα治療薬に対して応答せず、そして一部の患者は充分な応答の欠如のためにより多い用量又は投与頻度の調整を必要とする。個々の患者における薬剤バイオアベイラビリティ及び薬物動態の相違は、治療の失敗の原因となることがある。患者にＨＡＣＡ／ＨＡＨＡを発現させる薬剤の免疫原性は、軽度のアレルギー反応からアナフィラキシーショックまでの範囲の有害反応を生じさせることがあった。これらの問題は今や、多くの研究者、薬剤管理機関（drug-controlling agencies）、健康保険会社、及び製薬会社によって認識されている。さらに、或る抗ＴＮＦα薬に対して二次応答不全の多くの患者は他の抗ＴＮＦα薬への切り替えから利益を得るが、このことは治療に用いられたタンパク質に対して特異的に指向された中和抗体の役割を示唆している（Radstake et al., Ann. Rheum. Dis., 68(11):1739-45 (2009)）。従って、薬剤投与を個々の患者に合わせることができかつ患者に対するリスクをほとんど又は全く伴わずに効果的かつ経済的に長期の治療を施すことができるように薬剤及びＨＡＣＡ／ＨＡＨＡについて患者を監視することが必要とされる（Bendtzen et al., Scand. J. Gastroenterol., 44(7):774-81 (2009)）。

【０２０６】
　幾つかの酵素結合免疫測定法を用いて循環血液中の薬剤及びＨＡＣＡ／ＨＡＨＡのレベルが評価されてきた。図１０は、ＨＡＣＡの測定に用いることができる現行のアッセイを本発明の新規なＨＡＣＡアッセイと比較した要約を提供する。現行の方法の限界の１つは

、循環血液中に測定することのできる量の薬剤が存在する場合に抗体レベルの測定が困難であるということである。ＩＦＸの投与の少なくとも8週間後でなければ測定を行うことができないＨＡＣＡ検出の現行の固相方法とは対照的に、本発明の新規なアッセイは、ＩＦＸを用いて治療されている間に患者由来の血清中のＨＡＣＡ及びＩＦＸレベルを測定することができる非放射性標識で液相のサイズ排除（ＳＥ）－ＨＰＬＣアッセイである。

【０２０７】

患者における抗ＴＮＦα生物学的薬剤及びＴＮＦα生物学的薬剤に対する抗体の血清濃度を測定することについての論拠は以下の通りである：（１）臨床試験におけるＰＫ研究に対し；（２）臨床試験の間にわたり生物学的薬剤に対する患者の免疫応答を監視することが；（３）ＨＡＣＡ又はＨＡＨＡを測定することによって生物学的薬剤に対する患者の応答を監視して各患者に対する薬剤投与量を導くことが；及び（４）最初の薬剤がうまくいかないときは異なる生物学的薬剤に切り替えるためのガイドとして用いるために、ＦＤＡによって要求されることがある。

【０２０８】

方法

患者血清中のインフリキシマブ（ＩＦＸ）レベルのＳＥ－ＨＰＬＣ分析。製造業者の使用説明書に従って、ヒト組換え型ＴＮＦαをフルオロフォア（「Ｆｌ」、例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８）で標識した。標識されたＴＮＦαを種々の量のＩＦＸ又は患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＦＬＤを用いてフリーのＴＮＦα－Ｆｌ及び結合したＴＮＦα－Ｆｌ免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。検量線から血清中のＩＦＸレベルを計算した。

【０２０９】

患者血清中のＨＡＣＡレベルのＳＥ－ＨＰＬＣ分析。精製したＩＦＸをＦｌで標識した。標識されたＩＦＸを種々の希釈度のプールしたＨＡＣＡ陽性血清又は希釈した患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。ＦＬＤを用いてフリーのＩＦＸ－Ｆｌ及び結合したＩＦＸ－Ｆｌ免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。結合したＩＦＸ－ＦｌとフリーのＩＦＸ－Ｆｌとの比を用いてＨＡＣＡレベルを決定した。

【０２１０】

血清中のＨＡＣＡを測定するためのモビリティシフトアッセイ手順。このアッセイの原理は、フリーのＦｌ標識されたＩＦＸに対するＨＡＣＡ結合したＦｌ標識されたインフリキシマブ（ＩＦＸ）複合体の、該複合体の分子量の増加によるサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）上でのモビリティシフトに基づく。このクロマトグラフィーは、分子量分画範囲５，０００～７０，０００及び移動相１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、流速０．５ｍＬ／ｍｉｎを有しＦＬＤを備えたＢｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００カラム（Phenomenex社）を用いて、Ａｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムにより実施した。Ｂｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍを用いたＡｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムの前のＳＥＣ－３０００カラムは、ＢｉｏＳｅｐ　７５ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００である分析用プレカラムである。各分析に対して試料体積１００μＬをカラム上にロードする。ＳＥ－ＨＰＬＣ分析の前に１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、溶出バッファ中で室温において１時間にわたりＩＦＸ治療された患者由来の血清及びＦｌ標識されたＩＦＸをインキュベートすることによってＨＡＣＡ結合したＦｌ標識されたＩＦＸ複合体を形成する。

【０２１１】

結果

図１１は、高分子量複合体のモビリティシフトによるフリーのＩＦＸ－ＦｌからのＨＡＣＡ結合したＩＦＸ－Ｆｌ複合体の分離を示す。パネルｃ及びｄからわかるように、蛍光ピークのリテンションタイムは２１．８分から１５．５～１９．０分へシフトした。反応

混合物中にＨＡＣＡが多く存在すればするほど、クロマトグラムにはより少ないフリーＩＦＸ－Ｆｌが残りそしてより多く免疫複合体が形成される。図１２は、ＨＡＣＡの添加によって生じた蛍光ピークシフトの用量反応曲線を示す。ＨＡＣＡ陽性試料を用いて、本発明者らは血清の１：１０００希釈でピークシフトを検出することができた。

【０２１２】

図１３は、高分子量複合体のモビリティシフトによるフリーのＴＮＦα－ＦｌからのＩＦＸ結合したＴＮＦα－Ｆｌ複合体の分離を示す。パネルｃ及びｄからわかるように、蛍光ピークのリテンションタイムは２４分から１３～１９．５分へシフトした。反応混合物中にＩＦＸが多く存在すればするほど、クロマトグラムにはより少ないフリーのＴＮＦα－Ｆｌが残りそしてより多く免疫複合体が形成される。図１４は、ＩＦＸの添加によって生じたＴＮＦα－Ｆｌピークシフトの用量反応曲線を示す。添加されたＩＦＸに基づき、検出限界は血清中ＩＦＸ１０ｎｇ／ｍＬである。

【０２１３】

架橋アッセイによって測定されたＨＡＣＡ陽性及び陰性患者由来の血清試料を試験することによって本発明の新規なモビリティシフトアッセイの妥当性確認を行った（表２）。このアッセイを用いて、本発明者らは、ＩＦＸを用いて治療された１１７人のＩＢＤ患者及び５０人の健常被験者由来の血清試料を分析した。５０の健常被験者試料全てが検出限界未満のＩＦＸレベルを有しているのに対し、６５の患者試料は平均ＩＦＸ濃度１１．０μｇ／ｍＬを有している。表３は、架橋アッセイ及びモビリティシフトアッセイによって測定された健常対照及びＩＦＸを用いて治療されたＩＢＤ患者の血清中のＨＡＣＡレベルを示す。架橋アッセイはモビリティシフトアッセイより少ないＨＡＣＡ陽性患者及びより多い誤陰性並びにより多い誤陽性を検出した。

【表２】

架橋アッセイ対ＳＥ－ＨＰＬＣアッセイにおける強い陽性及び陰性からの患者血清中の相対的ＨＡＣＡレベルの相関

	架橋アッセイ	ＨＰＬＣシフトアッセイ	相関
陽性	８２	８１	９９％
陰性	１２	１２	１００％

【表３】

架橋アッセイ（カットオフ１．６９μｇ／ｍＬ）及びＨＰＬＣシフトアッセイ（カットオフ０．１９、結合ＩＦＸとフリーＩＦＸとの比）を用いたＨＡＣＡの血清レベルについての患者試料分析

	患者（ｎ）	ＨＡＣＡ陽性		架橋アッセイ	
		架橋アッセイ	ＨＰＬＣアッセイ	誤陰性	誤陽性
健常対照	５０	Ｎ／Ａ	０	Ｎ／Ａ	Ｎ／Ａ
ＩＦＸ治療された患者	１１７	２４（２０．５％）	３３（２８．２％）	９（高ＩＦＸ）	９

誤陰性の結果は、ＨＡＣＡ決定における架橋アッセイを妨げる高レベルのＩＦＸを含有する患者血清によって生じるが、ＳＥ－ＨＰＬＣアッセイは影響を受けない。誤陽性の結果は、架橋アッセイを妨げることがある高レベルの非特異的な干渉物質を含有する患者血清によって生じる。

【０２１４】

図１５は、ＩＦＸ治療過程の間のＩＢＤ患者におけるＨＡＣＡレベルとＩＦＸ濃度との関係を示す。ＨＡＣＡはＶ１０（３０週間）という早期に検出することができそしてＩＦＸ治療の間にわたり一部の患者で増加し続けた。図１６は、本発明のアッセイを用いてＩＦＸの存在下でＨＡＣＡを検出することができることを示す。血清中のより高レベルのＨＡＣＡは、検出することができたより低レベルのＩＦＸと関連していた（例えば、バイオアベイラビリティを低下させた）。このようにＩＦＸを用いて治療中の間のＨＡＣＡの早期検出は、医師及び／又は患者が他の抗ＴＮＦα薬に切り替え又はＩＦＸの用量を増加させるように導くことができる。

【０２１５】

結論

フルオロフォア（「Ｆｌ」）で抗ＴＮＦα生物学的薬剤を容易に標識することができ、

そしてＨＡＣＡ／ＨＡＨＡを測定するのに用いられるモビリティシフトアッセイフォーマットは典型的なＥＬＩＳＡのような固体表面への抗原のコーティング及び複数回の洗浄及びインキュベーション工程を伴わないホモジニアスアッセイである。Ｆｌ標識されたＩＦＸのＨＡＣＡ陽性血清とのインキュベーションは、ＳＥ－ＨＰＬＣにおいてフリーのＦｌ標識されたＩＦＸと比べて異なる位置に溶出する免疫複合体の形成を生じさせ、このようにしてＨＡＣＡの量を定量化することができる。他の血清成分の存在はこのモビリティシフトアッセイにほとんど影響を及ぼさない。このモビリティシフトアッセイフォーマットは、ＥＬＩＳＡと異なり、無関係のＩｇＧ類の非特異的結合によって影響されることなくＩｇＧ４イソタイプを検出する。健常血清試料はＦｌ標識されたＩＦＸのモビリティシフトを生じさせることはなく、そしてＩＦＸを用いて治療された患者の２８．２％がＨＡＣＡを有することが本発明のアッセイによって見出された。このように、本明細書中に記載したアッセイフォーマットは極めて感度がよく、患者血清中の全ての生物学的薬剤（例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、ＨＵＭＩＲＡ、Ｅｎｂｒｅｌ及びＣｉｍｚｉａ）並びにそれらの抗体（例えば、抗ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、抗ＨＵＭＩＲＡ、抗Ｅｎｂｒｅｌ及び抗Ｃｉｍｚｉａ）を検出するのに適用することができる。とりわけ、本発明のモビリティシフトアッセイを用いてＩＦＸの存在下にＨＡＣＡを検出することができるので、ＩＦＸを用いて治療中の間のＨＡＣＡの早期検出は医師及び／又は患者が他の抗ＴＮＦα薬に切り替え又はＩＦＸの今後の用量を増加させるように導くことができる。

【０２１６】

本発明者らは、ＩＦＸを用いて治療された患者から得られた血清試料中のＩＦＸ及びＨＡＣＡレベルを測定するための新規な非放射性標識で液相のＳＥ－ＨＰＬＣアッセイを開発した。この新規なアッセイは高い感度、正確度、及び精度を有し、そして結果は高い再現性を有しており、このことはこのアッセイを多数のヒト血清試料の日常試験に適したものとする。この新規なアッセイフォーマットは、ＥＬＩＳＡと異なり、固体表面への抗原のコーティングを省きかつ無関係なＩｇＧ類の非特異的結合による影響を受けない。本明細書中に記載したアッセイフォーマットのこれらの利点は、試験の誤陰性及び誤陽性の結果を低減させる。有利なことに、本発明のアッセイフォーマットは極めて高感度であり、これを用いて患者が治療中の間に血清中に存在する全ての生物学的薬剤並びにそれらの抗体を検出することができる。

【０２１７】

実施例４．新規なモビリティシフトアッセイを用いた患者血清中の中和及び非中和ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）の間の識別

本例は、患者試料（例えば、血清）中の自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）濃度を測定し及びかかる自己抗体が中和自己抗体又は非中和自己抗体のいずれであるかを、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて蛍光標識されたＴＮＦαの存在下に蛍光標識された抗ＴＮＦα薬に対するこれらの自己抗体の結合を検出して決定するための新規なホモジニアスアッセイを説明する。これらのアッセイは、低親和性のＨＡＣＡを除去する洗浄工程を不要にし、バックグランド及び血清干渉問題を低減する可視及び／又は蛍光スペクトルでの検出を可能にする明確な（distinct）フルオロフォアを用い、高感度の蛍光標識検出により低力価で患者の中和又は非中和ＨＡＣＡを検出する能力を増大させ、そして液相反応として生じることによってＥＬＩＳＡプレートなどの固体表面への結合によるエピトープにおける任意の変化の機会を低減させるので、有利である。

【０２１８】

或る典型的な実施形態において、抗ＴＮＦα薬（例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））をフルオロフォア「Ｆ１」で標識し（例えば、図１７Ａ参照）、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はその双方により検出することができる。同様に、ＴＮＦαをフルオロフォア「Ｆ２」で標識し（例えば、図１７Ａ参照）、フルオロフォアは同様に可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はその双方により検出することができ、そして「Ｆ１」と「Ｆ２」は異なるフルオロフォアである。標識された抗ＴＮＦα薬を液相反応によりヒト血清とインキュベートし、そして標識されたＴ

ＮＦαをこの反応に加えて標識された抗ＴＮＦα薬、標識されたＴＮＦα、及び／又は血清中に存在するＨＡＣＡの間で複合体（すなわち、免疫複合体）を形成させる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識された抗ＴＮＦαへの自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）及び標識されたＴＮＦαの双方の結合は、自己抗体と標識された抗ＴＮＦα薬との間の二重複合体（例えば、図１７Ａの「免疫複合体２」）、標識された薬剤単独、又は標識されたＴＮＦα単独と比べてピークの左側へのシフトを生じさせる（例えば、図１７Ａの「免疫複合体１」）。この自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）と、標識されたＴＮＦαと、及び標識された抗ＴＮＦα薬との三重複合体の存在は、血清試料中に存在する自己抗体が抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を干渉しないような、非中和型の自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）であることを示す。図１７Ａに示すように、１つの特定の実施形態において、血清中に非中和性ＨＡＣＡが存在する場合に、Ｆ１－ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及びＦ２－ＴＮＦαの双方についてシフトが観察され、これは免疫複合体１及び免疫複合体２の双方のピークの増加とフリーのＦ１－ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及びフリーのＦ２－ＴＮＦαのピークの低下とをもたらす。しかしながら、自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）と、標識されたＴＮＦαと、標識された抗ＴＮＦα薬との三重複合体が存在しない、自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）と標識された抗ＴＮＦα薬との間の二重複合体（例えば、図１７Ｂの「免疫複合体２」）の存在は、血清試料中に存在する自己抗体が、抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を干渉するような、中和型の自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）であることを示す。図１７Ｂに示すように、１つの特定の実施形態において、中和ＨＡＣＡが血清中に存在する場合には、Ｆ１－ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）についてシフトが観察され、これは免疫複合体２ピークの増加と、フリーのＦ１－ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）ピークの低下と、フリーのＦ２－ＴＮＦαピークの無変化とをもたらす。或る場合に、中和性ＨＡＣＡの存在は、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を用いた目下の治療をＨＵＭＩＲＡ（商品名）などの別の抗ＴＮＦα薬に切り替えるべきことを示す。

【０２１９】

これに代わる実施形態において、標識された抗ＴＮＦα薬を最初に液相反応においてヒト血清とインキュベートして標識された抗ＴＮＦα薬と血清中の存在するＨＡＣＡとの間で複合体（すなわち、免疫複合体）を形成させる。インキュベーション後、試料を直接に第一のサイズ排除カラム上にロードする。標識された抗ＴＮＦα薬への自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）の結合は、標識された薬剤単独と比べてピークの左側へのシフト（例えば、図１８の「免疫複合体２」）を生じさせる。次いで、標識されたＴＮＦαをこの反応に加えて、標識された抗ＴＮＦα薬への結合に対して標識されたＴＮＦαが自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）と置き換わり（例えば、競合し）、それによって標識された抗ＴＮＦα薬と標識されたＴＮＦαとの間の複合体（すなわち、免疫複合体）を形成させることができるか否かを決定する。インキュベーション後、試料を直接に第二のサイズ排除カラム上にロードした。標識されたＴＮＦαへの標識された抗ＴＮＦα薬の結合は、標識されたＴＮＦα単独に比べてピークの左側へのシフトを生じさせる（例えば、図１８の「免疫複合体３」）。標識されたＴＮＦαの添加による自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）と標識された抗ＴＮＦα薬との間の結合の分裂は、血清試料中に存在する自己抗体が、抗ＴＮＦα薬とＴＮＦαとの間の結合を妨げるような中和型の自己抗体（例えば、ＨＡＣＡ）であることを示す。或る場合には、中和性ＨＡＣＡの存在はＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を用いた目下の治療をＨＵＭＩＲＡ（商品名）などの別の抗ＴＮＦαに切り替えるべきことを示す。

【０２２０】

実施例５．新規なホモジニアスモビリティシフトアッセイを用いた患者血清中のアダリムマブに対するヒト抗薬剤抗体（ＡＤＡ）の分析

背景及び目的：ＴＮＦαに対するモノクローナル抗体、例えば、インフリキシマブ（ＩＦＸ）、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））、及びセルトリズマブは、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）及び他の炎症性疾患を治療するのに有効であることが示されている。抗薬剤抗体（ＡＤＡ）は薬剤の効果を低下させ及び／又は有害作用を引き起こすことがある。しかしながら、ＡＤＡはキメラ抗体インフリキシマブを用いて治療された患者にだけでなく、

ヒト化抗体アダリムマブを用いて治療された患者にも見出されている。個々の患者のＡＤＡ及び薬剤レベルの監視は、患者の治療及び投薬を最適化するのに役立つことができる。本発明者らは、患者由来の血清中のＨＡＣＡ（ヒト抗キメラ抗体）及びＩＦＸの双方を正確に測定する、非放射性標識で液相のホモジニアスモビリティシフトアッセイを開発した。このアッセイ方法は、ＨＡＣＡを検出するための現在の固相アッセイの主たる限界、すなわち、循環血液中のＩＦＸの存在下にＨＡＣＡを正確に検出することができないこと、を克服する。本研究において、本発明者らは、ヒト化抗体薬、アダリムマブを用いて治療された患者の血清中のＡＤＡ及び薬剤レベルを測定するこの新規な方法を評価した。

【０２２１】

方法：このモビリティシフトアッセイは、サイズ排除分離におけるフリー抗原に対する抗原抗体免疫複合体のリテンションタイムのシフトに基づくものであった。フルオロフォアで標識されたアダリムマブ又はＴＮＦ－α及び内部標準を血清試料と混合して、ＡＤＡ又は薬剤の存在下でフリーのアダリムマブ及びＴＮＦ－αのモビリティシフトを測定した。フリーアダリムマブ又はＴＮＦ－αの内部標準に対する比の変化が免疫複合体形成の指標である。種々の濃度の抗ヒトＩｇＧ抗体又は精製アダリムマブと共にインキュベートすることによって作成した検量線を用いてＡＤＡ又はアダリムマブの血清濃度を決定した。モビリティシフトアッセイを用いて、本発明者らは、アダリムマブを用いて治療されたＩＢＤ患者で応答を失った患者から採取した血清中のアダリムマブ及びＡＤＡレベルを測定した。

【０２２２】

結果：標識されたアダリムマブのモビリティシフトの測定に対し抗ヒトＩｇＧ抗体を用いて用量反応曲線を作成した。このアッセイの検出限界は抗ヒトＩｇＧ　１ｎｇであった。ＡＤＡについて５０の健常対照由来の血清を試験したところ全ての試料が検出限界未満のＡＤＡレベルを有していた（すなわち、フリーの標識されたアダリムマブのシフトはなかった）。外因的に添加されたアダリムマブの存在下でＡＤＡの検出も実証された。アダリムマブを用いて治療された患者の薬剤濃度を測定するために、本発明者らは標識されたＴＮＦ－αのモビリティシフトについて種々の量のアダリムマブを用いて検量線を作成し、そしてアダリムマブの検出限界は１０ｎｇであった。

【０２２３】

結論：本発明の非放射性標識で液相のホモジニアスモビリティシフトアッセイを適用して、アダリムマブを用いて治療された患者由来の血清試料中のＡＤＡ及びアダリムマブのレベルを測定した。このアッセイは、高い感度及び正確度を有し再現性のあることが見出され、そしてアダリムマブを用いて治療された患者由来の血清試料中のＡＤＡレベルを評価するのに用いることができる。

【０２２４】

実施例６．新規な独自の（Proprietary）モビリティシフトアッセイを用いた患者血清中のアダリムマブに対する抗薬剤抗体（ＡＤＡ）の分析

要約

背景：抗ＴＮＦ－α薬剤、例えば、インフリキシマブ（ＩＦＸ）及びアダリムマブ（ＡＤＬ）などは炎症性腸疾患（ＩＢＤ）を治療するのに有効であることが示されている。しかしながら、治療された患者におけるＡＤＡの誘発は薬剤の効果を低下させ及び／又は有害作用を引き起こすことがある。実際に、ＡＤＡはＩＦＸを用いて治療された患者だけでなく、ＡＤＬを用いて治療された患者にも見出されている。個々の患者のＡＤＡ及び薬剤レベルの監視は、患者の治療及び投薬を最適化するのに役立つことができる。本発明者らは、ＩＦＸ治療された患者由来の血清中のＨＡＣＡ（ヒト抗キメラ抗体）及びＩＦＸの双方を正確に測定する、独自のモビリティシフトアッセイを開発した。このアッセイは、ＨＡＣＡを検出するための現在の固相アッセイの主たる限界、すなわち、循環血液中のＩＦＸの存在下にＨＡＣＡを正確に検出することができないこと、を克服する。本研究において、本発明者らは、完全ヒト化抗体薬、ＡＤＬを用いて治療された患者の血清中のＡＤＡ及び薬剤レベルを測定するこの新規なアッセイを評価した。

【０２２５】
方法：このモビリティシフトアッセイは、サイズ排除クロマトグラフィーにおけるフリー抗原に対する抗原抗体免疫複合体のリテンションタイムのシフトに基づくものであった。フルオロフォアで標識されたＡＤＬ又はＴＮＦ－α及び内部標準を血清試料と混合して、ＡＤＡ又は薬剤の存在下での標識されたＡＤＬ及びＴＮＦ－αのモビリティシフトを測定した。フリーＡＤＬ又はＴＮＦ－αの内部標準に対する比の変化が免疫複合体形成の指標である。種々の濃度の抗ヒトＩｇＧ抗体又は精製ＡＤＬと共にインキュベートすることによって作成した検量線を用いてＡＤＡ又はＡＤＬの血清濃度を決定した。このアッセイを用いて、本発明者らは、ＡＤＬを用いて治療されたＩＢＤ患者から採取した血清中のＡＤＬ及びＡＤＡレベルを測定した。

10

【０２２６】
結果：標識されたＡＤＬのモビリティシフトの測定に対し抗ヒトＩｇＧ抗体を用いて用量反応曲線を作成した。このアッセイの検出限界は抗ヒトＩｇＧ１０ｎｇであった。ＡＤＡについて１００人の健常対照由来の血清を試験したところ全ての試料が検出限界未満のＡＤＡレベルを有していた（すなわち、フリーの標識されたＡＤＬのシフトはなかった）。ＡＤＬを用いて治療された１１４人のＩＢＤ患者の中で５つにおいてＡＤＡの検出が示された。ＡＤＬを用いて治療された患者の薬剤濃度を測定するために、本発明者らは標識されたＴＮＦ－αのシフトについて種々の量のＡＤＬを用いて検出限界１０ｎｇの検量線を作成した。

20

【０２２７】
結論：本発明者らは、本発明者らの独自の非放射性標識で液相のホモジニアスモビリティシフトアッセイを適用して、ＡＤＬを用いて治療された患者由来の血清試料中のＡＤＡ及びＡＤＬのレベルを測定した。このアッセイは、高い感度及び正確度を有し再現性があり、ＡＤＬを用いて治療された患者由来の血清試料中のＡＤＡレベルを評価するのに有効である。

【０２２８】
序論

抗腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）生物学的製剤、例えば、インフリキシマブ（ＩＦＸ）、エタネルセプト、アダリムマブ（ＡＤＬ）、及びセルトリズマブ ペゴルなどは、クローン病（ＣＤ）及び慢性関節リウマチ（ＲＡ）を含む多くの自己免疫疾患において疾患活性を低減させることが示されている。しかしながら、一部の患者では抗ＴＮＦ－α治療に応答せず、また、他の患者では充分な応答が欠如しているためより多量の又はより高頻度の投与が必要であるか、又は注入反応を発現する。

30

【０２２９】
患者に薬剤に対する抗体を発現させる治療抗体の免疫原性は、治療の失敗及び注入反応の原因となることがある。ＩＦＸのようなキメラ抗体は、ＡＤＬなどの完全ヒト化抗体と比べて抗体産生を誘発するより高い潜在能力を有する。ＲＡ患者におけるＩＦＸに対する抗体（ＨＡＣＡ）の発生率（prevalence）は１２％から４４％まで変化しそして患者血清中のＩＦＸのレベル及び治療応答に反比例するように見える。完全ヒト化ＡＤＬはマウス又はキメラ抗体より免疫原性が少ないように思われる一方で、幾つかの研究ではヒト抗ヒト化抗体（ＨＡＨＡ）の形成が報告されており、また、ＲＡ及びＣＤ患者において１％から８７％までの抗体産生の発生率が示されている（Aikawa et al., Immunogenicity of Anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. Clin. Rev. Allergy Immunol., 38(2-3):82-9 (2010)）。

40

【０２３０】
１つの抗ＴＮＦα薬に対する二次応答不全を起こした多くの患者は、別の抗ＴＮＦα薬へ切り替えること又は用量を増量すること及び／又は投与頻度を増加させることから利益を受けることがある。従って、薬剤投与を個々の患者に適合させることができるように、薬剤及び抗薬剤抗体（ＡＤＡ）レベルについて患者を監視することが求められる。このアプローチは、保証される（warranted）場合には用量の調整を、又はＡＤＡレベルが存在

50

する場合には投薬の中止を可能にする。（Bendtzen et al., Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. Scand. J. Gastroenterol., 44(7):774-81 (2009); Afif et al., Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol., 105(5):1133-9 (2010)）。

【０２３１】

ＨＡＣＡ及びＨＡＨＡを測定するための多くのアッセイが開発されてきた。現行の方法の限界の１つは、循環血液中に高いレベルの薬剤が存在する場合にＡＤＡレベルを容易には測定することができないことである。

【０２３２】

本発明者らは、ＡＤＬを用いて治療された患者由来の血清中のＡＤＡ及びＡＤＬレベルを測定するための、血清中の薬剤の存在により影響を受けない独自の非放射性標識で液相のモビリティシフトアッセイを開発した。

【０２３３】

方法

フルオロフォア（Ｆｌ）標識されたＡＤＬを患者血清とインキュベートして免疫複合体を形成した。Ｆｌ標識された小ペプチドを各反応において内部標準として含めた。種々の量の抗ヒトＩｇＧを用いて検量線を作成して血清中のＡＤＡレベルを決定した。サイズ排除クロマトグラフィーによって、フリーのＦｌ標識されたＡＤＬをその分子量に基づいて抗体結合複合体から分離した。各試料からフリーのＦｌ標識ＡＤＬ対内部標準の比を用いて検量線からＨＡＨＡ濃度を外挿した。同様の方法を用いて、Ｆｌ標識されたＴＮＦ－αによって患者血清試料中のＡＤＬレベルを測定した。

【０２３４】

結果

図１９は、高分子量の複合体のモビリティシフトによるフリーＦｌ－ＡＤＬからの抗ヒトＩｇＧ結合Ｆｌ－ＡＤＬ複合体の分離を示す。パネルｃ～ｈに示したように、蛍光ピークのリテンションタイムは１０．１分から７．３～９．５分へシフトした。反応混合物に抗ヒトＩｇＧをより多く添加すればするほど、クロマトグラムにはより少ないフリーＡＤＬが残りそしてより多く免疫複合体が形成される（ｈ～ｃ）。内部標準のリテンションタイムは１３．５分である。

【０２３５】

図２０は、抗ヒトＩｇＧの添加によって生じた蛍光ピークシフトの用量反応曲線を示す。抗ヒトＩｇＧの濃度を増加させると、免疫複合体の形成のためにフリーＡＤＬ対内部標準の比は低下する。アッセイ感度は抗ヒトＩｇＧ１０ｎｇ／ｍＬである。内部標準「Ｆｌ－ＢｉｏＣｙｔ」は、緑色蛍光性Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８フルオロフォアをビオチン及びアルデヒド固定性（aldehyde-fixable）第一アミン（リシン）と結合するＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８－ビオシチン（ＢｉｏＣｙｔ）に対応する（Invitrogen社；カリフォルニア州カールスバッド）。

【０２３６】

図２１は、高分子量複合体のモビリティシフトによるフリーのＴＮＦ－α－ＦｌからのＡＤＬ結合したＴＮＦ－α－Ｆｌ複合体の分離を示す。パネルｃ及びｊに示したように、蛍光ピークのリテンションタイムは１１．９分から６．５～１０．５分へシフトした。反応混合物中にＡＤＬが多く存在すればするほど、クロマトグラムにはより少ないフリーのＴＮＦ－α－Ｆｌピークが残りそしてより多く免疫複合体が形成される。

【０２３７】

図２２は、ＡＤＬの添加によって生じたＴＮＦ－α－Ｆｌピークシフトの用量反応曲線を示す。添加されたＡＤＬに基づいて、検出限界は血清中ＡＤＬ１０ｎｇ／ｍＬである。

【０２３８】

表４は、１００人の健常被験者及びＡＤＬを用いて治療された１１４人のＩＢＤ患者に

由来する血清試料を、本発明のモビリティシフトアッセイを用いてＡＤＡ及びＡＤＬレベルについて分析した内容を示す。１００の健常被験者試料は全て検出限界未満のＡＤＡレベルを有していた（フリーＦｌ－ＡＤＬのシフトなし）が、一方で、１１４の患者試料のうち５つは０．０１２～＞２０μｇ／ｍＬのＡＤＡ濃度を有していた。１００の健常被験者試料におけるＡＤＬレベルの平均値は０．７６±１．０μｇ／ｍＬ（範囲０～９．４μｇ／ｍＬ）であった。ＡＤＬを用いて治療された患者由来の１１４の血清試料中のＡＤＬレベルの平均値は１０．８±１７．８μｇ／ｍＬ（範囲０～１３９μｇ／ｍＬ）であった。ＡＤＡ陽性試料の５つのうち４つは検出不能レベルのＡＤＬを有していた。

【表４】

モビリティシフトアッセイによって測定された患者血清中のＡＤＡ及びＡＤＬレベル

	被験者（ｎ）	性別（男性／女性）	年齢（歳）（平均値）	ＡＤＡ陽性	ＡＤＬレベル（μｇ／ｍＬ）
健常対照	１００	３８／６２	１８～６２（３７．１）	０	０．７６±１．００
ＡＤＬ治療されたＩＢＤ患者	１１４	５１／６３	２０～６９（３９．９）	５(４．３%)	１０．８０±１７．８０

【０２３９】

表５は、１００人の健常被験者及びＡＤＬを用いて治療された１１４人のＩＢＤ患者由来の血清試料のさらなる解析を提供する。とりわけ、ＡＤＬ０～４μｇ／ｍＬを有する４２の患者試料のうち４つは平均ＡＤＡ濃度０．０１２～＞２０μｇ／ｍＬを有していた。４つのＡＤＡ陽性試料のうち４つは検出不能レベルのＡＤＬを有していた。ＡＤＡの検出のために、ＡＤＬを用いて治療された１１４人のＩＢＤ患者をＡＤＬ０～４μｇ／ｍＬ及びＡＤＬ＞４μｇ／ｍＬの２つのカテゴリーに分けた。４μｇ／ｍＬを超えるＡＤＬの患者をより多量のＡＤＬ－Ｆｌを用いて試験することにより循環血液中のＡＤＬのＡＤＬ－Ｆｌとの競合を検討することができる。

【表５】

モビリティシフトアッセイによって測定された患者血清中のＡＤＡ及びＡＤＬのレベル

	被験者（ｎ）	性別（男性／女性）	年齢（平均値）	ＡＤＬレベル（μｇ／ｍＬ）	ＡＤＡ陽性
健常対照	１００	３８／６２	１８～６２（３７．１）	０．７６±１．００	０
ＡＤＬ治療されたＩＢＤ患者	１１４	５１／６３	２０～６９（３９．９）	１０．８０±１７．８０	０～４μｇ／ｍＬ ＡＤＬ:４２のうち４(９．５２%)

【０２４０】

結論

ＨＡＣＡ／ＩＦＸの測定に用いたモビリティシフトアッセイフォーマットは、固体表面への抗原のコーティングを伴わず、かつ典型的なＥＬＩＳＡのような複数回の洗浄及びインキュベーション工程を伴わないホモジニアスアッセイである。このアッセイを適用してＡＤＡ及び抗ＴＮＦ薬を測定することができる。このアッセイの感度（μｇ／ｍＬ範囲）は、ＥＬＩＳＡ法（ｍｇ／ｍＬ範囲）と比較して患者血清に関するＡＤＡ及びＡＤＬ双方の測定に対して高感度である。健常対照の血清試料はＦｌ標識されたＡＤＬのモビリティシフトを生じさせなかったが、ＡＤＬを用いて治療された患者の４．３％はこのアッセイによってＡＤＡを有することが見出された。とりわけ、ＡＤＬ０．４μｇ／ｍＬを有する患者の９．５２％はこのアッセイにおいてＡＤＡを有することが見出された。健常試料及び患者試料のより高濃度のＡＤＬ－Ｆｌを用いたさらなる評価を行う予定である。健常対照の血清試料は、Ｆｌ標識されたＴＮＦ－αのモビリティシフトを生じさせたが、これはＴＮＦ－αの可溶性のフリーの受容体の存在によるものであったとすることができ、ＡＤＬを用いて治療された患者のＡＤＬの平均はそれよりずっと高かった（１０．８μｇ／ｍＬ対０．７６μｇ／ｍＬ）。患者がＡＤＬ治療を受けている間にＡＤＡを早期に検出し及びＡＤＬ薬剤レベルを監視することは、医師がＡＤＬの投与量を最適化し又は適切な場合

には別の抗ＴＮＦ－α薬に切り替え、そしてそのことによって患者の疾病の全体的な管理を最適化することを可能にする。
【０２４１】
実施例７：ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及びヒト抗薬剤抗体の濃度レベルの決定
　本例は、血清試料中の抗ＴＮＦα薬、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）、のレベルを決定し、並びにヒト抗薬剤抗体、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）に対するヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）、のレベルを決定する方法を説明する。
【０２４２】
工程１：試料中のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）の濃度レベルの決定
【０２４３】
　１つの典型的な実施形態において、ＴＮＦαをフルオロフォア（例えば、Ａｌｅｘａ$_{647}$）で標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はその双方によって検出することができる。標識されたＴＮＦαを液相反応によりヒト血清とインキュベートして血清中に存在する抗ＴＮＦα薬を結合させる。標識されたＴＮＦαを液相反応により既知量の抗ＴＮＦα薬とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識されたＴＮＦαへの抗ＴＮＦα薬の結合は、標識されたＴＮＦα単独と比べてピークの左側へのシフトを生じさせる。そして、血清試料中に存在する抗ＴＮＦα薬の濃度を検量線及び対照と比較することができる。
【０２４４】
患者血清中のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）（インフリキシマブ）のＳＥ－ＨＰＬＣ分析
　製造業者の使用説明書に従って、ヒト組換え型ＴＮＦαをフルオロフォア、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８で標識した。標識されたＴＮＦαを種々の量のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）又は患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。蛍光標識検出を用いてフリーの標識されたＴＮＦα及び結合した標識されたＴＮＦα免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。検量線から血清中のＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）レベルを計算した。
【０２４５】
　以下の方程式がこのアッセイに当てはまる：
方程式Ｉ：標識されたＴＮＦα＋ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）→（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$
方程式ＩＩ：［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］$_{標識されたＴＮＦαなしに存在}$＝［（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$］
方程式ＩＩＩ：［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］＝［（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$］／［標識されたＴＮＦα］×［標識されたＴＮＦα］
【０２４６】
　工程１において、既知量の標識されたＴＮＦαを、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）含有血清試料と接触させる。標識されたＴＮＦαとＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）とは複合体、（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$を形成する（方程式Ｉ参照）。ほとんど全てのＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）が標識されたＴＮＦαと複合体を形成するので、標識されたＴＮＦαの導入前に存在するＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の濃度は、標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）$_{複合体}$の測定濃度と等しくなる（方程式ＩＩ参照）。［（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$］／［標識されたＴＮＦα］の比に［標識されたＴＮＦα］を乗じることによって、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の濃度レベルを計算する（方程式ＩＩＩ参照）。［（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$］／［標識されたＴＮＦα］の比は、サイズ排除ＨＰＬＣからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから、（標識されたＴＮＦα・ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名））$_{複合体}$ピークに対する曲線下面積を積分し、そして前

記プロットから標識されたＴＮＦαピークに対する曲線下面積の結果として得られる積分でこの数を除することによって得られる。［標識されたＴＮＦα］は演繹的に（a priori）知られる。

【０２４７】

工程２：ヒト抗キメラ抗体ＨＡＣＡのレベル決定

【０２４８】

１つの典型的な実施形態において、抗ＴＮＦα薬、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、をフルオロフォア、例えば、Ａｌｅｘａ$_{６４７}$、で標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はその双方によって検出することができる。標識された抗ＴＮＦα薬を液相反応によりヒト血清とインキュベートして血清中に存在するＨＡＣＡを結合させる。標識された抗ＴＮＦα薬を液相反応により既知量の抗ＩｇＧ抗体又はプールした陽性患者の血清とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識された抗ＴＮＦα薬への自己抗体の結合は、標識された薬剤単独と比べてピークの左側へのシフトを生じさせる。そして、血清試料中に存在するＨＡＣＡの濃度を検量線及び対照と比較することができる。

【０２４９】

患者血清中のＨＡＣＡレベルのＳＥ－ＨＰＬＣ分析。精製ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）をフルオロフォアで標識した。標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を種々の希釈度のプールしたＨＡＣＡ陽性血清又は希釈した患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。蛍光標識検出を用いてフリーの標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及び結合した標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。結合した標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）とフリーのＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）との比を用いて以下のようにＨＡＣＡレベルを決定した。

【０２５０】

血清中のＨＡＣＡを測定するためのモビリティシフトアッセイ手順。このアッセイの原理は、フリーのＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）に対する抗薬剤抗体、例えば、ＨＡＣＡ、のＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）との複合体の、該複合体の分子量の増加によるサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）上でのモビリティシフトに基づく。このクロマトグラフィーは、分子量分画範囲５，０００～７０，０００及び移動相１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、流速０．５～１．０ｍＬ／ｍｉｎを有し蛍光標識検出、例えば、６５０ｎｍでのＵＶ検出、を備えたＢｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００カラム（Phenomenex社）を用いて、Ａｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムにより実施する。Ｂｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍを用いたＡｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムの前のＳＥＣ－３０００カラムは、ＢｉｏＳｅｐ　７５ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００である分析用プレカラムである。各分析に対して試料体積１００μＬをカラム上にロードする。ＳＥ－ＨＰＬＣ分析の前に１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、溶出バッファ中で室温において１時間にわたりＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）治療された患者由来の血清及び標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）をインキュベートすることによってＨＡＣＡ及び標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）複合体の複合体を形成する。

【０２５１】

以下の方程式がこのアッセイに当てはまる：

方程式ＩＶ：ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）＋標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）＋ＨＡＣＡ→（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ）$_{複合体}$＋（標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ）$_{複合体}$

方程式Ｖ：［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］／［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ$_{複合体}$］＝［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ$_{複合体}$］

方程式ＶＩ：［ＨＡＣＡ］＝［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ］複合体＋［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ］複合体
方程式ＶＩＩ：［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］＝［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］×［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］
方程式ＶＩＩＩ：［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］＝［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］×［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］

【０２５２】
方程式ＩＸ：［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］有効量＝［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］－［ＨＡＣＡ］

【０２５３】
ヒト抗ＴＮＦα薬抗体、例えば、ＨＡＣＡ、の濃度レベルの決定。既知濃度の標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）を血清試料に添加する。ＨＡＣＡはＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）又は標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）のいずれかと複合体を形成する（方程式ＩＶ参照）。［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］を上記工程１において決定する。標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体に対する曲線下面積を積分しそしてこの数をフリーの標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）に対する曲線下面積に対して得られる積分で除することによって、［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］対［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］の比を得る。［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］対［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］の比は［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］対［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ）複合体］の比に等しい（方程式Ｖ参照）。ＨＡＣＡはＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）及び標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の双方と平衡して複合体を形成するので、ＨＡＣＡの総量はＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体の量と標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体の量の合計に等しい（方程式ＶＩ参照）。［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］対［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］の比は［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］対［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体］の比に等しいので、［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－ＨＡＣＡ］複合体及び［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）－ＨＡＣＡ複合体］の双方は、［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体）］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］の比に、工程１において決定されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の濃度量、及び演繹的に知られる標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の濃度量をそれぞれ乗じることによって決定される（方程式ＶＩＩ及びＶＩＩＩ参照）。従って、ＨＡＣＡの総量は、（１）工程１からの［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］に［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ）複合体］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］を乗じた値と、（２）演繹的に知られる［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］に［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ）複合体］／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］を乗じた値との合計に等しい。

【０２５４】
ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の有効濃度レベルの決定。ＨＡＣＡはＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）と複合体を形成するので、血清試料中で利用することのできるＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の有効量は、工程１において測定されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の量から、工程２から測定されたＨＡＣＡの量を引いた量である（方程式ＩＸ参照）。

【０２５５】
典型的な計算。Ｖ１０での患者ＪＡＧにおける［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］は７．５μｇ／ｍＬであると決定された（図１６ｃ参照）。この結果は工程１に従いかつ方程式Ｉ～ＩＩＩを用いることによって得られた。７．５μｇ／ｍＬは３０ｎｇ／４μＬに等しい。試料４μＬを工程２の測定に用いたので、分析された試料中に合計３０．０ｎｇのＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）が存在していた。Ｖ１０での患者ＪＡＧの［標識されたＲＥＭＩ

ＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ］複合体／［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］の比は０．２５であった（図１６ｂ参照）。試料中に導入された［標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］は３７．５ｎｇ／１００μＬであった。工程２の測定に標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）１００μＬを用いたので、分析された試料中に合計３７．５ｎｇの標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）が存在していた。方程式ＶＩＩを用いると、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体の総量は３０ｎｇに０．２５を乗じた値であったが、これは標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体７．５ｎｇに等しい。方程式ＶＩＩＩを用いると、標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体の総量は３７．５ｎｇに０．２５を乗じた値であったが、これは標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）・ＨＡＣＡ複合体９．４ｎｇに等しい。方程式ＶＩを用いると、ＨＡＣＡの総量は９．４ｎｇと７．５ｎｇとの合計に等しく、これはＨＡＣＡ１６．９ｎｇに等しい。ＨＡＣＡ１６．９ｎｇが試料４μＬ中に存在していた。［ＨＡＣＡ］は１６．９ｎｇ／４μＬであったが、これは４．２３μｇ／ｍＬに等しい。方程式ＩＸを用いると、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）の有効量は、工程１から決定されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）７．５μｇ／ｍＬから工程２から決定されたＨＡＣＡ４．２３μｇ／ｍＬを引いたものに等しい。この典型的な計算では、有効な［ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）］は３．２７μｇ／ｍＬに等しかった。

【０２５６】
実施例８．ＨＵＭＩＲＡ（商品名）及びヒト抗薬剤抗体の濃度レベルの決定
　本例は、血清試料中のＨＵＭＩＲＡ（商品名）のレベルを決定する方法並びにヒト抗ヒト抗体（ＨＡＨＡ）のレベルを決定する方法を説明する。

【０２５７】
工程１：試料中のＨＵＭＩＲＡ（商品名）の濃度レベルの決定

【０２５８】
　１つの典型的な実施形態において、フルオロフォア（例えば、Ａｌｅｘａ６４７）を用いてＴＮＦαを標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はそれらの双方によって検出することができる。標識されたＴＮＦαを液相反応によりヒト血清とインキュベートして、血清中に存在する抗ＴＮＦα薬を結合させる。標識したＴＮＦαを液相反応により既知量の抗ＴＮＦα薬とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識されたＴＮＦαへの抗ＴＮＦα薬の結合は、標識されたＴＮＦα単独に比べてピークを左側にシフトさせる。次いで、血清試料中に存在する抗ＴＮＦα薬の濃度を検量線及び対照と比較することができる。

【０２５９】
患者血清中のＨＵＭＩＲＡ（商品名）レベルのＳＥ－ＨＰＬＣ分析。製造業者の使用説明書に従って、ヒト組換え型ＴＮＦαをフルオロフォアＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８で標識した。標識されたＴＮＦαを種々の量のＨＵＭＩＲＡ（商品名）又は患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。蛍光標識検出を用いてフリーの標識されたＴＮＦα及び結合した標識されたＴＮＦα免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。検量線から血清中のＨＵＭＩＲＡ（商品名）レベルを計算した。

【０２６０】
　以下の方程式がこのアッセイに当てはまる：
方程式Ｘ：標識されたＴＮＦα＋ＨＵＭＩＲＡ（商品名）→（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））複合体
方程式ＸＩ：［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］＝［（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））複合体］
方程式ＸＩＩ：［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］＝［（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））複合体］／［標識されたＴＮＦα］×［標識されたＴＮＦα］

10
20
30
40
50

【０２６１】
　工程１において、既知量の標識されたＴＮＦαを、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）含有血清試料と接触させる。標識されたＴＮＦαとＨＵＭＩＲＡ（商品名）とは複合体、（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$を形成する（方程式Ｘ参照）。ほとんど全てのＨＵＭＩＲＡ（商品名）が標識されたＴＮＦαと複合体を形成するので、標識されたＴＮＦαの導入前に存在するＨＵＭＩＲＡ（商品名）は、測定された［（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$］と等しくなる（方程式ＸＩ参照）。［（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$］／［標識されたＴＮＦα］の比に［標識されたＴＮＦα］を乗じることによって、［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］を計算する（方程式ＸＩＩ参照）。標識されたＴＮＦαに対する曲線下面積及び（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$に対する曲線下面積を積分し、そして（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$に対して得られる積分を標識されたＴＮＦαに対して得られる積分で除することによって、［（標識されたＴＮＦα・ＨＵＭＩＲＡ（商品名））$_{複合体}$］対［標識されたＴＮＦα］の比が得られる。［標識されたＴＮＦα］は演繹的に知られる。
【０２６２】
工程２：ヒト抗ヒト抗体、例えば、ＨＡＨＡのレベルの決定。１つの典型的な実施形態において、抗ＴＮＦα薬、例えば、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）、をフルオロフォア、例えば、Ａｌｅｘａ$_{６４７}$、で標識し、フルオロフォアは可視スペクトル及び蛍光スペクトルのいずれか一方又はその双方によって検出することができる。標識された抗ＴＮＦα薬を液相反応によりヒト血清とインキュベートして血清中に存在するＨＡＨＡを結合させる。標識された抗ＴＮＦα薬を液相反応により既知量の抗ＩｇＧ抗体又はプールした陽性患者血清とインキュベートして検量線を作成することもできる。インキュベーション後、試料を直接にサイズ排除カラム上にロードする。標識された抗ＴＮＦα薬への自己抗体の結合は、標識された薬剤単独と比べてピークの左側へのシフトを生じさせる。次に、血清試料中に存在するＨＡＨＡの濃度を検量線及び対照と比較することができる。
【０２６３】
患者血清中のＨＡＨＡレベルのＳＥ－ＨＰＬＣ分析。精製ＨＵＭＩＲＡ（商品名）をフルオロフォアで標識した。標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）を種々の希釈度のプールしたＨＡＨＡ陽性血清又は希釈した患者血清と１時間にわたり室温でインキュベートした。体積１００μＬの試料をＨＰＬＣシステム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。蛍光標識検出を用いてフリーの標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）及び結合した標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）免疫複合体をそれらのリテンションタイムに基づいてモニターした。結合した標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）とフリーの標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）との比を用いて以下に説明するようにＨＡＨＡレベルを決定した。
【０２６４】
血清中のＨＡＨＡを測定するためのモビリティシフトアッセイ手順。このアッセイの原理は、フリーのＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）に対する抗体、例えば、ＨＡＨＡ、が結合したＡｌｅｘａ$_{６４７}$標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）複合体の、該複合体の分子量の増加によるサイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）上でのモビリティシフトに基づく。このクロマトグラフィーは、分子量分画範囲５，０００～７０，０００及び移動相１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、流速０．５～１．０ｍＬ／ｍｉｎを有し蛍光標識検出、例えば、６５０ｎｍでのＵＶ検出、を備えたＢｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００カラム（Phenomenex社）を用いて、Ａｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムにより実施する。Ｂｉｏ－Ｓｅｐ　３００ｘ７．８ｍｍを用いたＡｇｉｌｅｎｔ－１２００ＨＰＬＣシステムの前のＳＥＣ－３０００カラムは、ＢｉｏＳｅｐ　７５ｘ７．８ｍｍ　ＳＥＣ－３０００である分析用プレカラムである。各分析に対して試料体積１００μＬをカラム上にロードする。各分析に対して試料体積１００μＬをカラム上にロードする。ＳＥ－ＨＰＬＣ分析の前に１Ｘ　ＰＢＳ、ｐＨ７．３、溶出バッファ中で室温において１時間にわたりＨＵＭＩＲＡ治療された患者由来の血清及び標

識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）をインキュベートすることによってＨＡＨＡ結合した標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）複合体を形成する。
方程式ＸＩＩＩ：ＨＵＭＩＲＡ（商品名）＋標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）＋ＨＡＨＡ→（ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ）複合体＋（標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ）複合体
方程式ＸＩＶ：［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］／［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］＝［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］／［標識されたＨＵＭＩＲＡ・ＨＡＨＡ複合体］
方程式ＸＶ：［ＨＡＨＡ］＝［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］＋［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］
方程式ＸＶＩ：［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］＝［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］×［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］／［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］
方程式ＸＶＩＩ：［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］＝［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］×［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］／［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］
【０２６５】
方程式ＸＶＩＩＩ：［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］有効量＝［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］－［ＨＡＨＡ］
【０２６６】
工程２についての計算。既知濃度の標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）を血清試料に添加する。ＨＡＨＡはＨＵＭＩＲＡ（商品名）又は標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）のいずれかと複合体を形成する（方程式ＸＩＩＩ参照）。［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］を上記したように工程１において決定する。標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体に対する曲線下面積及び標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）に対する曲線下面積を積分しそして標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体に対して得られる積分を標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）に対して得られる積分で除することによって、［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］対［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］の比を得る。［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］対［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］の比は［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］対［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］の比に等しい（方程式ＸＩＶ参照）。ＨＡＨＡはＨＵＭＩＲＡ（商品名）及び標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）の双方と平衡して複合体を形成するので、ＨＡＨＡの総量はＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体の量と標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体の量の合計に等しい（方程式ＸＶ参照）。［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］対［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］の比は［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］対［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］の比に等しいので、［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）－ＨＡＨＡ複合体］及び［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）－ＨＡＨＡ複合体］の双方の濃度は、［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ複合体］／［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］の比に、工程１において決定された［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］、及び演繹的に知られる［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］をそれぞれ乗じることによって決定される（方程式ＸＶＩ及びＸＶＩＩ参照）。ＨＡＨＡはＨＵＭＩＲＡ（商品名）と複合体を形成するので、血清試料中で利用することのできるＨＵＭＩＲＡ（商品名）の有効量は、工程１から測定されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）の量から、工程２から測定されたＨＡＨＡの量を引いた量である（方程式ＸＶＩＩＩ参照）。
【０２６７】
典型的な計算。患者ＳＬ０３２４６０１３（図２５参照）において、［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］は１６．９μｇ／ｍＬであると決定された（図２５参照）。この結果は工程１に従いかつ方程式Ｘ～ＸＩＩを用いることによって得られた。１６．９μｇ／ｍＬは６７．６ｎｇ／４μＬに等しい。試料４μＬを工程２の測定に用いたので、分析された試料中に

合計６７．６ｎｇのＨＵＭＩＲＡ（商品名）が存在していた。患者ＳＬ０３２４６０１３の［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ］$_{複合体}$／［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］の比は０．０５５であった（図２５参照）。試料中に導入された［標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）］は３７．５ｎｇ／１００μＬであった。工程２の測定に標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）１００μＬを用いたので、分析された試料中に合計３７．５ｎｇの標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）が存在していた。方程式ＸＶＩを用いると、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ$_{複合体}$の総量は６７．６ｎｇに０．０５５を乗じた値であって、標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ$_{複合体}$３．７１ｎｇに等しい。方程式ＸＶＩＩを用いると、標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ$_{複合体}$の総量は３７．５ｎｇに０．０５５を乗じた値であって、これは標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）・ＨＡＨＡ$_{複合体}$２．０６ｎｇに等しい。方程式ＸＶを用いると、ＨＡＨＡの総量は３．７１ｎｇと２．０６ｎｇとの合計に等しく、ＨＡＨＡ５．７７ｎｇに等しい。ＨＡＨＡ５．７７ｎｇが試料４μＬ中に存在していた。［ＨＡＨＡ］は５．７７ｎｇ／４μＬであったが、これは１．４４μｇ／ｍＬに等しい。方程式ＸＶＩＩＩを用いると、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）の有効量は、工程１から決定されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）１６．９９μｇ／ｍＬから、工程２から決定されたＨＡＨＡ１．４４μｇ／ｍＬを引いたものに等しい。この典型的な計算では、有効な［ＨＵＭＩＲＡ（商品名）］は１５．４６μｇ／ｍＬに等しかった。

【０２６８】
実施例９．ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）、又は標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）のいずれかとＨＡＣＡ又はＨＡＨＡとの複合体の量の決定

本例は、内部標準を参照してＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）、又は標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）のいずれかとＨＡＣＡ又はＨＡＨＡとの複合体の量を決定する方法を説明する。

【０２６９】
内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、を用いることによって、或る試験から別の試験への血清人為産物（artifacts）及び変形を同定しそして正確に分析することができる。内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８の量は、分析される１００μＬ当たり約５０～約２００ｐｇである。

【０２７０】
フルオロフォア（Ｆｌ）で標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）を患者血清とインキュベートして免疫複合体を形成した。Ｆｌ標識された小ペプチド、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、を各反応において内部標準として含めた。或る場合に、種々の量の抗ヒトＩｇＧを用いて検量線を作成して血清中のＨＡＨＡレベルを測定した。別の場合には、精製ＨＡＨＡを用いてキャリブレートされている滴定されたプール陽性患者血清を用いて検量線を作成して血清中のＨＡＨＡレベルを決定した。さらに別の場合には、実施例７に記載した方法を用いて検量線を作成して血清中のＨＡＨＡレベルを決定した。サイズ排除クロマトグラフィーによって、フリーの標識されたＨＵＭＩＲＡを抗体結合複合体からその分子量に基づいて分離した。各試料からフリーの標識されたＨＵＭＩＲＡ対内部標準の比を用いて検量線からＨＡＨＡ濃度を外挿した。同様の方法を用いて、標識されたＴＮＦ－αによって患者血清試料中のＨＵＭＩＲＡレベルを測定した。

【０２７１】
標識された薬剤、すなわち、標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）又は標識されたＨＵＭＩＲＡ、対内部標準の初期比は１００に等しい。図２３及び２４に示したように、標識された薬剤対内部標準の比が９５未満に低下したときは、標識された薬剤が抗薬剤結合性化合物、例えば、ＨＡＣＡ、ＨＡＨＡと複合体化されていると推定される。［標識された薬剤］対［内部標準］の比は、標識された薬剤に対する曲線下面積及び内部標準に対する曲線下面積を積分しそして次に標識された薬剤に対して得られる積分を内部標準に対して得られる積分で除することによって得られる。

【０２７２】
実施例１０：複合体化された抗ＴＮＦα薬対複合体化されていない抗ＴＮＦα薬の比の決定
　複合体化された抗ＴＮＦα薬対複合体化されていない抗ＴＮＦα薬の比は、複合体化された抗ＴＮＦα薬に対する曲線下面積及び複合体化されていない抗ＴＮＦα薬に対する曲線下面積の双方を積分しそして次に複合体化された抗ＴＮＦα薬に対して得られる積分を複合体化されていない抗ＴＮＦα薬に対して得られる積分で除することによって得られる。
【０２７３】
　１つの実施形態において、複合体化されていない抗ＴＮＦα薬は、試料中約０ｎｇ～１００ｎｇのレベルを有するＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）である。標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）は約３７．５ｎｇである。
【０２７４】
　内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、を用いることによって、或る試験から別の試験への血清人為産物及び変形を同定しそして正確に分析することができる。内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、の量は、分析される１００μＬ当たり約５０～約２００ｐｇである。
【０２７５】
　標識された抗ＴＮＦα薬、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）又はＨＵＭＩＲＡ（商品名）、対標識された内部標準の比は、標識された抗ＴＮＦα薬に対する曲線下面積及び標識された内部標準に対する曲線下面積の双方を積分しそして次に標識された抗ＴＮＦα薬に対して得られる積分を標識された内部標準に対して得られる積分で除することによって得られる。
【０２７６】
　［（標識された抗ＴＮＦα薬・自己抗体）$_{複合体}$］／［内部標準］の比は、サイズ排除ＨＰＬＣからの溶出時間の関数としてのシグナル強度のプロットから、（標識された抗ＴＮＦα薬・自己抗体）$_{複合体}$ピークに対する曲線下面積を積分し、そして前記プロットから内部標準ピークに対する曲線下面積の結果として得られる積分でこの数を除することによって得られる。或る実施形態において、標識された抗ＴＮＦα薬は標識されたＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）である。或る他の実施形態において、標識された抗ＴＮＦα薬は標識されたＨＵＭＩＲＡ（商品名）である。
【０２７７】
実施例１１：フリーの標識されたＴＮＦαと複合体化された標識されたＴＮＦαとの比の決定
　本例は、標識されたＴＮＦαのＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）又はＨＵＭＩＲＡ（商品名）との複合体の量を内部標準を参照して決定する方法を説明する。
【０２７８】
　内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、を用いることによって、或る試験から別の試験への血清人為産物及び変形を同定しそして正確に分析することができる。内部標準、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８、の量は、分析される１００μＬ当たり約１～約２５ｎｇである。
【０２７９】
　１つの実施形態において、複合体化されていない標識されたＴＮＦαは試料中約５０ｎｇ～１５０ｎｇのレベルを有している。或る場合に、標識されたＴＮＦαの量は約１００．０ｎｇである。
【０２８０】
　フルオロフォア（Ｆｌ）で標識されたＴＮＦαを患者血清とインキュベートして免疫複合体を形成した。Ｆｌ標識された小ペプチド、例えば、Ｂｉｏｃｙｔｉｎ－Ａｌｅｘａ４８８を各反応において内部標準としてインキュベートした。精製抗ＴＮＦα薬を既知濃度でスパイクすることによって検量線を作成しそして次にその検量線から外挿することによ

ってμｇ／ｍＬ単位で濃度を決定した。

【０２８１】

標識されたＴＮＦα対内部標準の初期比は１００に等しい。標識されたＴＮＦα対内部標準の比が９５未満に低下したときは、標識されたＴＮＦαが抗ＴＮＦα薬、例えば、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商品名）、ＨＵＭＩＲＡ（商品名）と複合体化されていると推定される。［標識されたＴＮＦα］対［内部標準］の比は、標識されたＴＮＦαに対する曲線下面積及び内部標準に対する曲線下面積を積分しそして次に標識されたＴＮＦαに対して得られる積分を内部標準に対して得られる積分で除することによって得られる。

【０２８２】

実施例１２：抗ＴＮＦα薬及び／又は抗薬剤抗体（ＡＤＡ）レベルを測定することによる抗ＴＮＦα薬治療の最適化

本例は、抗ＴＮＦα薬治療を受けている患者由来の試料中の抗ＴＮＦα薬の量（例えば、濃度レベル）（例えば、フリーの抗ＴＮＦα治療抗体のレベル）及び／又は抗薬剤抗体（ＡＤＡ）の量（例えば、抗ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベル）を測定することによって、抗ＴＮＦα薬治療を最適化し、抗ＴＮＦα薬治療に関連した毒性を低減し、及び／又は抗ＴＮＦα薬を用いた治療的処置の有効性を監視する方法を説明する。従って、本例に示した方法は、例えば、抗ＴＮＦα薬の今後の用量をいつ又はどのように調整又は変更する（例えば、増量又は減量する）かを決定することによって、抗ＴＮＦα薬を（例えば、増量、減量、又は同量で）１種又は２種以上の免疫抑制剤、例えば、メトトレキセート（ＭＴＸ）又はアザチオプリンといつ又はどのように組み合わせるかを決定することによって、及び／又は目下の治療過程をいつ又はどのように変更する（例えば、異なる抗ＴＮＦα薬に切り替える）かを決定することによって、治療決定を導くのに有効な情報を提供する。

【０２８３】

説明の目的だけのために、以下のシナリオは、本発明の方法が抗ＴＮＦα薬治療を受けている患者由来の試料中の抗ＴＮＦα薬のレベル（例えば、フリーの抗ＴＮＦα治療抗体のレベル）及び／又はＡＤＡのレベル（例えば、ＴＮＦα薬に対する自己抗体のレベル）に基づいて如何に有利に治療を最適化し及び毒性（例えば、副作用）を最小化若しくは低減することができるかを示す実例を提供する。本明細書に記載した新規なアッセイを用いて抗ＴＮＦα薬及びＡＤＡのレベルを測定することができる。

【０２８４】

<u>シナリオ＃１：低レベルの抗薬剤抗体（ＡＤＡ）を伴う高レベルの抗ＴＮＦα薬</u>

【０２８５】

薬剤レベル＝１０～５０ｎｇ／１０μＬ；ＡＤＡレベル＝０．１～２ｎｇ／１０μＬ。このプロファイルを有する患者試料として、ビジット１０（「Ｖ１０」）時の患者ＢＡＢ及びＪＡＡ由来の試料を挙げることができる。図１６ｂ参照。

【０２８６】

抗ＴＮＦα薬治療を受けておりかつこの特定のプロファイルを有する患者は、抗ＴＮＦα薬（例えば、インフリキシマブ）とともにアザチオプリン（ＡＺＡ）のような免疫抑制剤を用いて治療されなければならない。

【０２８７】

<u>シナリオ＃２：低レベルのＡＤＡを伴う中レベルの抗ＴＮＦα薬</u>

【０２８８】

薬剤レベル＝５～２０ｎｇ／１０μＬ；ＡＤＡレベル＝０．１～２ｎｇ／１０μＬ。このプロファイルを有する患者試料として、Ｖ１０時の患者ＤＧＯ、ＪＡＧ、及びＪＪＨ由来の試料を挙げることができる。図１６ｂ参照。

【０２８９】

抗ＴＮＦα薬治療を受けておりかつこの特定のプロファイルを有する患者は、より多い用量の抗ＴＮＦα薬（例えば、インフリキシマブ）とともにアザチオプリン（ＡＺＡ）のような免疫抑制剤を用いて治療されなければならない。当業者であれば、薬剤治療を最適

化するように目下の治療過程を適切なより多い量又はより少ない量、例えば、目下の用量より少なくとも約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、５．５倍、６倍、６．５倍、７倍、７．５倍、８倍、８．５倍、９倍、９．５倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍、又は１００倍多い又は少ない今後の用量に調整することができることがわかるであろう。

【０２９０】

シナリオ＃３：中レベルのＡＤＡを伴う中レベルの抗ＴＮＦα薬

【０２９１】

薬剤レベル＝５～２０ｎｇ／１０μＬ；ＡＤＡレベル＝０．５～１０ｎｇ／１０μＬ。このプロファイルを有する患者試料として、ビジット１０（「Ｖ１０」）時の患者ＪＭＭ及びビジット１４（「Ｖ１４」）時の患者Ｊ－Ｌ由来の試料を挙げることができる。図１６ｂ参照。

10

【０２９２】

抗ＴＮＦα薬治療を受けておりかつこの特定のプロファイルを有する患者は、異なる薬剤を用いて治療されなければならない。限定的でない例として、インフリキシマブ（ＩＦＸ）治療中でありかつ中レベルのＩＦＸ及びＡＤＡ（すなわち、ＨＡＣＡ）を有する患者は、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））を用いた治療に切り替えられなければならない。

【０２９３】

シナリオ＃４：高レベルのＡＤＡを伴う低レベルの抗ＴＮＦα薬

20

【０２９４】

薬剤レベル＝０～５ｎｇ／１０μＬ；ＡＤＡレベル＝３．０～５０ｎｇ／１０μＬ。このプロファイルを有する患者試料として、図１６ｂのビジット１４時の全ての患者に由来の試料を挙げることができる。

【０２９５】

抗ＴＮＦα薬治療を受けておりかつこの特定のプロファイルを有する患者は、異なる薬剤を用いて治療されなければならない。限定的でない例として、インフリキシマブ（ＩＦＸ）治療中でありかつ高レベルのＡＤＡ（すなわち、ＨＡＣＡ）を伴う低レベルのＩＦＸを有する患者は、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（商品名））を用いた治療に切り替えられなければならない。

30

【０２９６】

理解の明確化のために図面及び実施例によってある程度詳細に本発明を記載してきたが、当業者であれば特許請求の範囲に記載の範囲内で所定の変更及び変形を行うことができることは理解されるところであろう。さらに、本明細書中に示した各文献は、それら各文献が個々に参照により組み込まれたかのごとくと同程度までその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【図１】

TNF-Alexa647
+
Humira
TNF-Alexa647
Humira
1µg TNF-Alexa647
TNF-Alexa647
フリーAlexa647
23.639
27.924
mAU
min
1µg Humira
1µg TNF-Alexa647 + 1µg Humira
Humiraに結合した
TNF-Alexa647
18.071
面積: 792.339
23.617
27.919

【図２】

A
TNF-Alexa647へのHumira結合の用量反応曲線
mAU*s
ヒルスロープ 2.180
EC50 117.4
Log Humira[ng]
B
1% 正常ヒト血清中TNF-Alexa647への
Humira結合の用量反応曲線
mAU*s
ヒルスロープ 1.454
EC50 81.58
Log Humira[ng]
C
1% プールRA+患者血清中TNF-Alexa647への
Humira結合の用量反応曲線
mAU*s
ヒルスロープ 0.8481
EC50 218.3
Log Humira[ng]

【図３】

架橋アッセイ：
ニュートラアビジン
HRP
ビオチニル化
インフリキシマブ
ビオチン
マウス
ヒト
HACA
インフリキシマブ

【図４】

(1) Alexa647 標識されたRemicadeの調製
(2) 患者血清(HACA)とのインキュベーションにより複合体形成
(3) SE-HPLCによる複合体の定量化
(4) remicadeの存在下でのアッセイ試験
Alexa647-Remicade
+
HACA
インキュベーション
(2)
HACA
Alexa647-Remicade
SE-HPLC 分析
(3)
(1)
MW = 150kD
MW = 150kD
MW = 300kD

1

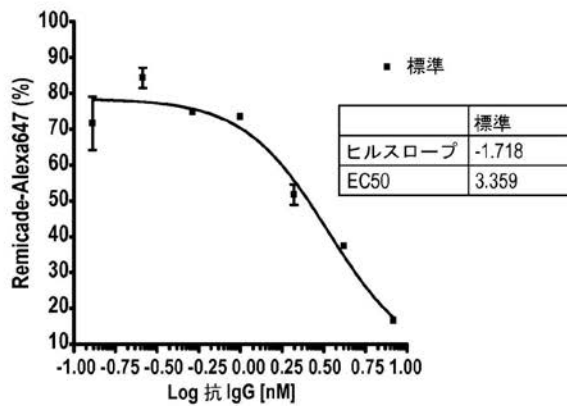
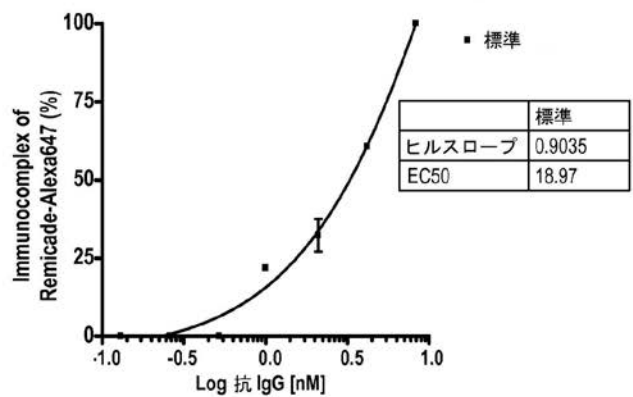
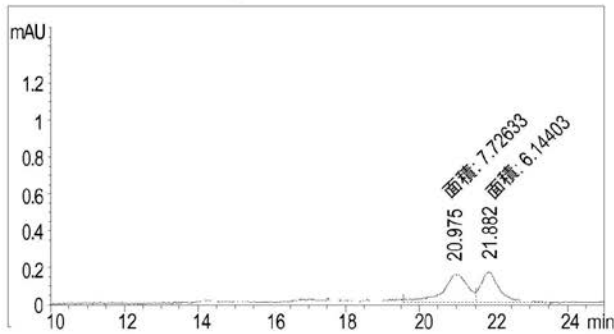
【図５】

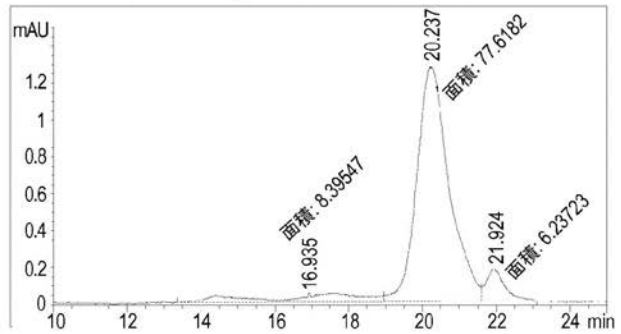
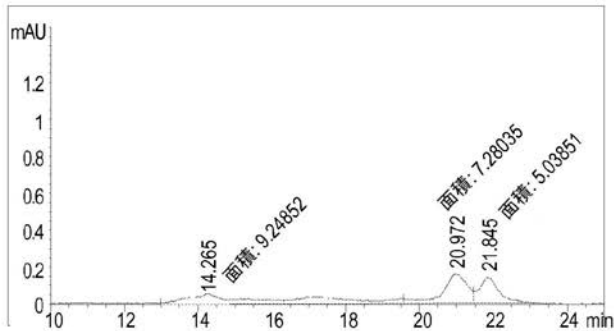
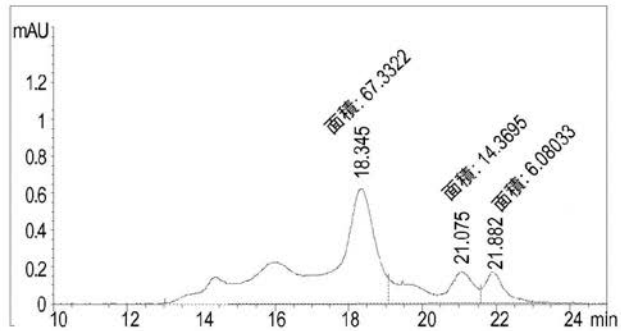
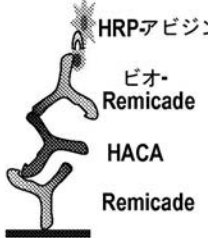
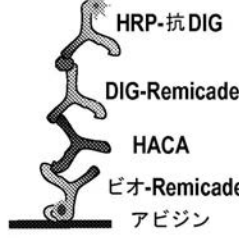
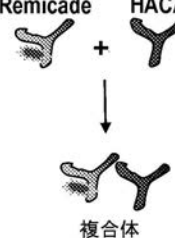
(A) 1X PBS, pH 7.4 (ブランク溶出)
(B) 125ng ヤギ抗ヒトIgG
(C) 6.25ng Remicade-Alexa647
20.108
面積 : 49.677
(D) 1.9ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
20.135
面積 : 39.3413
(E) 3.9ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
20.122
面積 : 43.2623
(F) 7.8ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
20.108
面積 : 37.5833
(G) 15.6ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
面積 : 10.872
17.029
20.096
面積 : 36.6918
(H) 31.2ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
面積 : 18.095
16.993
20.118
面積 : 27.1016
(I) 62.5ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
面積 : 29.1046
16.795
20.103
面積 : 18.8633
(J) 125ng ヤギ抗ヒトIgG + 6.25ng Remicade-Alexa647
14.340
面積 : 48.269
20.057
面積 : 8.49008
mAU
24 min

【図６】

62.5ng Remicade-Alexa647
20.108
面積: 49.677
Alexa
647nm
62.5ng Remicade-Alexa647 + 7.8ng 抗 IgG
20.108
面積: 37.5833
62.5ng Remicade-Alexa647 + 15.6ng 抗 IgG
17.029
面積: 10.872
20.096
面積: 36.6918
62.5ng Remicade-Alexa647 + 31.25ng 抗 IgG
16.993
面積: 18.095
20.118
面積: 27.1016
Alexa
647nm
mAU
min

【図７】

A.
種々の濃度の抗ヒトIgG抗体との
インキュベーション後に残るRemicade-Alexa647
の用量反応曲線
標準
	標準
ヒルスロープ	-1.718
EC50	3.359
Remicade-Alexa647 (%)
Log 抗 IgG [nM]
B.
種々の濃度の抗ヒトIgGの存在下での
Remicade-Alexa647 複合体の用量反応
標準
	標準
ヒルスロープ	0.9035
EC50	18.97
Immunocomplex of
Remicade-Alexa647 (%)
Log 抗 IgG [nM]

【図８】

【図９】

	架橋 ELISA		モビリティシフトアッセイ (4% 血清)		
登録 #	定量結果	定性結果	HACAシフトアッセイ	HACA 面積 /Remicade-647 面積	Remicade (nM)
SK07010477	22.26	陽性	陽性	0.78	3.33
SK07060083	1.41	陰性	陰性	**0.1**	4.06
SK07070083	1.41	陰性	陰性	**0.1**	8.81
SK07070305	1.41	陰性	陽性	0.46	7.34
SK07070595	1.41	陰性	陽性	0.25	8.35
SK07071213	2.48	陽性	陽性	0.16	5.30
SK07081127	22.07	陽性	陽性	0.28	3.00
SK07110035	1.41	陰性	陽性	0.18	**>66.7**
SK07141447	2.62	陽性	陽性	0.42	2.43
SK07171059	10.11	陽性	陽性	18.02	2.59
SK07171095	10.03	陽性	陽性	0.24	2.24
SK07210210	9.26	陽性	陽性	0.8	<0.67
SK07231216	25.58	陽性	陽性	完全なシフト	1.34
SK07310149	2.74	陽性	陽性	0.21	<0.67
SK08040168	22.21	陽性	陽性	完全なシフト	<0.67
SK08051035	9.72	陽性	陽性	8.7	1.89
SK08070307	2.49	陽性	陽性	0.23	3.14
SK08120222	9.2	陽性	陽性	0.25	<0.67
SK08260093	23.15	陽性	陽性	0.48	1.04
SK08260783	2.67	陽性	陽性	0.25	3.30
62.5ng Remicade - 647				**0.12**	
100ng TNF - 647					<0.67

【図１０】

	架橋HACAアッセイ	ビオチン及びDIGをベースとしたホモジニアス架橋ELISA	本発明のHACAアッセイ
アッセイフォーマット	HRP-アビジン ビオ-Remicade HACA Remicade	HRP-抗DIG DIG-Remicade HACA ビオ-Remicade アビジン	Fl-Remicade + HACA ↓ 複合体
非特異的バックグランド干渉	高	高	低
感度	低	中	高
偽陽性及び偽陰性の可能性	高	高	低
IgG4 HACA検出	なし	なし	あり
Igイソタイプ検出	なし	なし	あり
試料中薬剤の許容度	不充分	不充分	充分

【図１１】

【図１２】

【図１３】

4% NHS

300ng IFX+ 4% NHS + 100ng TNFα-Fl

30ng IFX + 4% NHS + 100ng TNFα-Fl

【図１４】

■ フリーTNF-FI
フリーTNF-FIの百分率 (%)
Log IFX [μg/ml]

■ 結合TNF-FI
結合TNF-FIの百分率 (%)
Log IFX [μg/ml]

【図１５】

IFX治療された患者の血清中の
相対的HACAレベル
a
結合IFX-FIとフリーIFX-FIとの比
V2
V10
V14
試料採取時

IFX治療された患者の血清中の
IFXレベル
b
インフリキシマブ濃度 (μg/ml)
V2
V10
V14
試料採取時

【図１６】

IFX治療過程の間の１人の患者血清中の相対的HACAレベル
a
LDC
結合IFX-FIとフリーIFX-FIとの比
0.350
0.325
0.300
0.275
0.250
0.225
0.200
0.175
0.150
V2
V10
V14
IFX治療後の11人の患者血清中の相対的HACAレベル
b
結合IFX-FIとフリーIFX-FIとの比
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
V10
V14
試料採取時
ALB
BAB
DGO
DIA
JAA
JAG
JJH
J-L
JLC
JMM
KLB
IFX治療後の11人の個別患者血清中のインフリキシマブ濃度
c
インフリキシマブ濃度 (μg/ml)
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
V10
V14
試料採取時
ALB
BAB
DGO
DIA
JAA
JAG
JJH
J-L
JLC
JMM
KLB

【図１７】

A. 非中和性HACAアッセイ
F1-Remicade
F2-TNF-α
HACA
F2-TNF-α
F1-Remicade
免疫複合体
免疫複合体
1
2
フリーF1-Remicade
フリーF2-TNF-α

B. 中和性HACAアッセイ
F1-Remicade
F2-TNF-α
HACA
HACA
F1-Remicade
F2-TNF-α
免疫複合体
2
フリーF1-Remicade
フリーF2-TNF-α

【図１８】

F1-Remicade
HACA
HACA
F1-Remicade
免疫複合体
2
フリーF1-Remicade

HACA
F1-Remicade
F2-TNF-α
F2-TNF-α
HACA
免疫複合体 3
フリーF2-TNF-α

【図１９】

a
NHS
b
NHS
37.5ng Fl-ADL
フリーFl-ADL (FA)
内部標準 (IC)
面積
c
NHS
37.5ng Fl-ADL
2μg Ab
d
NHS
37.5ng Fl-ADL
0.67μg Ab
e
NHS
37.5ng Fl-ADL
0.22μg Ab
f
NHS
37.5ng Fl-ADL
0.074μg Ab
g
NHS
37.5ng Fl-ADL
0.024μg Ab
h
NHS
37.5ng Fl-ADL
0.0082μgAb
FA
IC
C1
C2
LU
min

【図２０】

比 (Fl-ADL/Fl-BioCyt)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗ヒトIgG [µg/ml]

【図２１】

a
NHS
11.215
c
NHS
Fl-TNF
1µg ADL
FT
IC
14.055
e
NHS
Fl-TNF
0.1µg ADL
14.050
g
NHS
Fl-TNF
0.012µg ADL
14.046
i
NHS
Fl-TNF
0.001µg ADL
11.888
14.050
LU
min

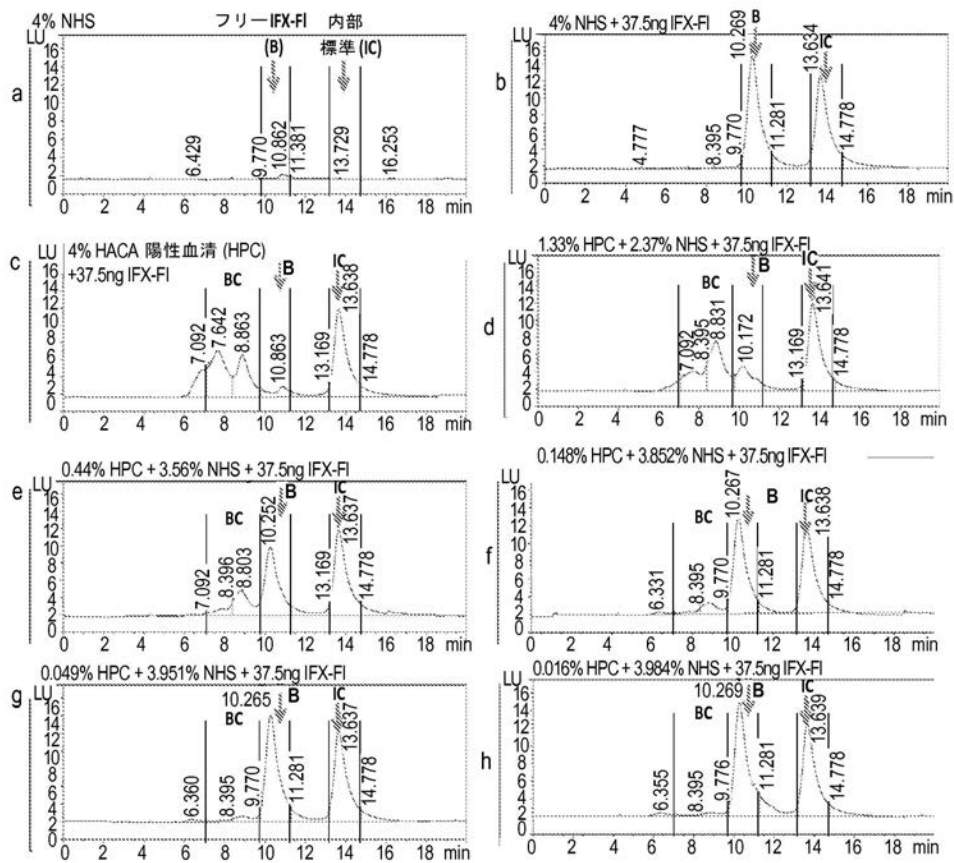
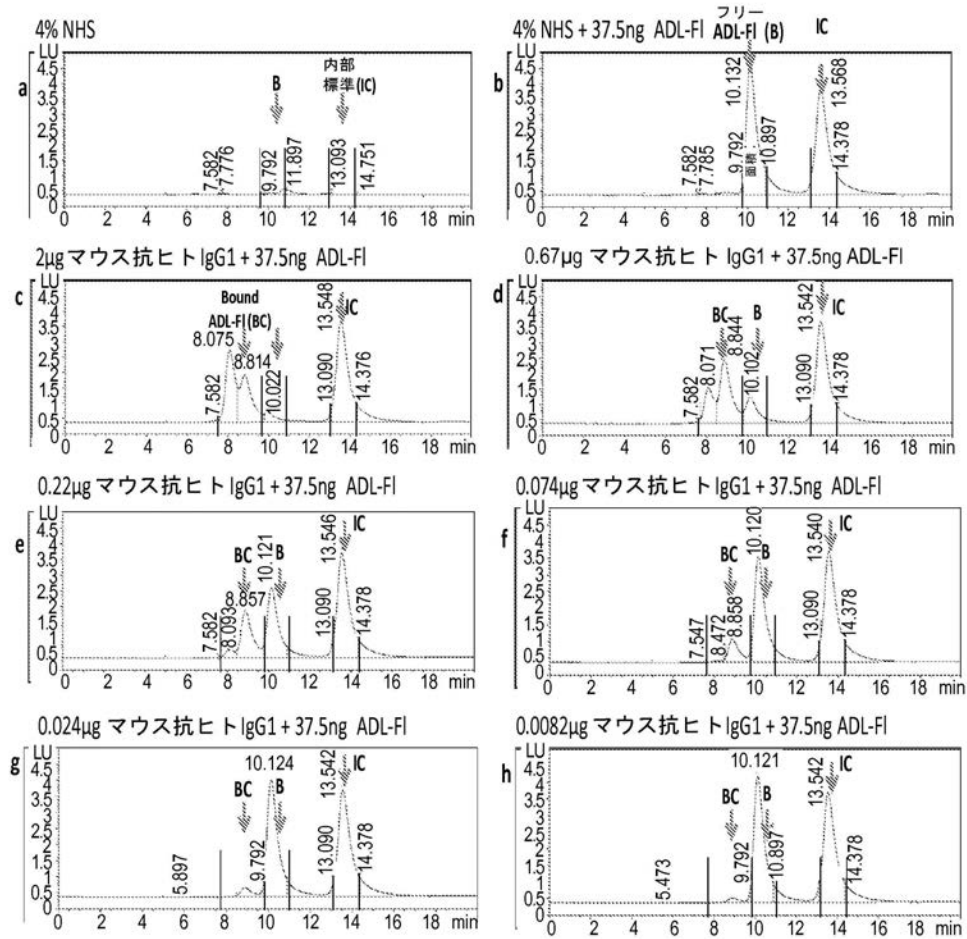
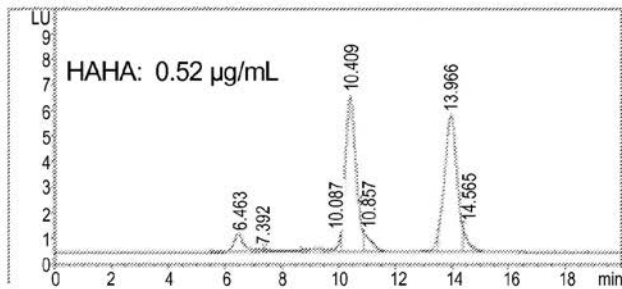
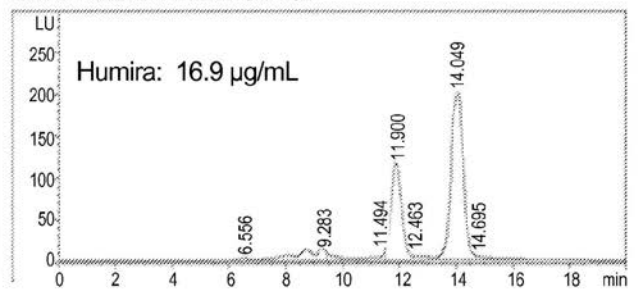
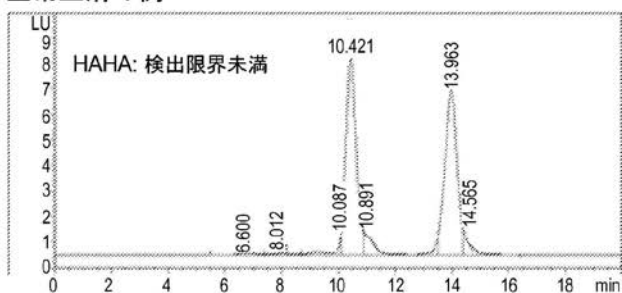
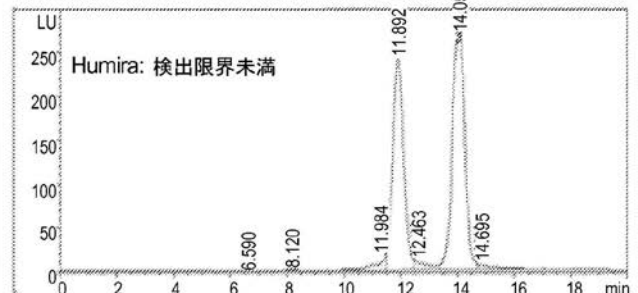
フリーTNF(FT)
内部標準 (IC)
b
NHS
Fl-TNF
11.892
14.055
d
NHS
Fl-TNF
0.3µg ADL
FT
IC
14.053
f
NHS
Fl-TNF
0.03µg ADL
14.056
h
NHS
Fl-TNF
0.004µg ADL
14.049
j
NHS
Fl-TNF
0.0003µg ADL
11.895
14.056
LU
min

【図２２】

ヒルスロープ	-1.813
EC50	1.213

【図２３】

【図２４】

【図２５】

【配列表】

2013508739000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/054125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 G01N33/564
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/035216 A1 (SVENSON MORTEN [DK] ET AL) 5 February 2009 (2009-02-05) abstract; figure 1 paragraph 6, last sentence paragraph [0057] - paragraph [0059] paragraph [0082] paragraph [0097] paragraph [0138]; examples ----- -/--	1-84

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 March 2011	29/03/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Luis Alves, Dulce

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/054125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BENDTZEN KLAUS ET AL: "Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab", ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 54, no. 12, December 2006 (2006-12), pages 3782-3789, XP002626408, ISSN: 0004-3591 abstract p.3782 - "Serum testing"; page 3783, left-hand column -----	22,75
A	CHEIFETZ A ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES: IMMUNOGENICITY, AND ASSOCIATED INFUSION REACTIONS", MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE, JOHN WILEY & SONS, INC, NEW YORK, NY, US, vol. 72, no. 4, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 250-256, XP008059895, ISSN: 0027-2507 abstract page 251, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 -----	1-74
A	CANAN AYBAY ET AL: "Demonstration of specific antibodies against infliximab induced during treatment of a patient with ankylosing spondylitis", RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL ; CLINICAL AND EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 26, no. 5, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 473-480, XP019335344, ISSN: 1437-160X, DOI: DOI:10.1007/S00296-005-0085-0 abstract page 475, right-hand column, paragraph 3 - page 476, left-hand column, paragraph 1 -----	41,59

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/054125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009035216 A1	05-02-2009	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 31/519	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 39/395	N	
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 31/519		
Ａ６１Ｐ 37/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 37/00		
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ａ６１Ｐ 33/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 33/00		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/02		
		Ａ６１Ｐ 1/04		

(31)優先権主張番号　61/345,567
(32)優先日　平成22年5月17日(2010.5.17)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/351,269
(32)優先日　平成22年6月3日(2010.6.3)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/389,672
(32)優先日　平成22年10月4日(2010.10.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/393,581
(32)優先日　平成22年10月15日(2010.10.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　シン　シャラット
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９２１２７，ランチョ　サンタ　フェ，トップ　オブ　ザ　モーニング　ウェイ　８１７１
(72)発明者　ワン　シュウイ　ロン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９２１３０，サン　ディエゴ，サドル　マウンテン　コート　４５５５
(72)発明者　オールムント　リンダ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９２１０６，サン　ディエゴ，テニーソン　ストリート　３５１９

Ｆターム(参考)　4C085 AA14 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 CB09 NA20 ZA02 ZA66 ZA96 ZB07 ZB11 ZB26
ZB33 ZB35 ZB37